

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie



**Bc. Jaromír Novák**

Imunoskóre ve 3D tkáních

Immunoscore in 3D tissue

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Karel Drbal, Ph.D.

Praha, 2020



# PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci zpracoval samostatně na základě konzultací se školitelem a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 9. 8. 2020

Jaromír Novák



# PODĚKOVÁNÍ

Předně bych rád poděkoval vedoucímu mé práce RNDr. Karlu Drbalovi, Ph.D. za cenné rady, vstřícnost a podporu. Rád bych také poděkoval svým kolegyním Bc. Michaelle Šimové a MSc. Betül Melike Ogan za přátelské pracovní prostředí a zaučení experimentálních metod. Mgr. Petře Hadlové bych chtěl zvláště poděkovat za vstřícnost s jakou mi poskytovala cenné rady k experimentální i teoretické části práce. Mé díky patří i prof. RNDr. Janu Černému, Ph.D. a jeho studentům Mgr. Valérii Grobárové, Ph.D., Mgr. Janu Pačesovi a Mgr. Karolíně Knížkové za konzultace a materiální podporu. Heleně Chmelové, Ph.D. a Martinu Čapkovi, Ph.D. děkuji za pomoc s mikroskopickými metodami a analýzou obrazových dat. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat mým rodičům a mé přítelkyni za podporu kterou mi poskytovali po celou dobu studia.



# ABSTRAKT

Pevné nádory představují komplexní struktury, které zahrnují kromě transformovaných buněk cévy, složky extracelulární matrix (ECM), rozpustné molekuly a širokou paletu různých typů buněk. Tyto složky dohromady tvoří nádorové mikrostředí. Z buněčných typů, které jsou součástí nádorového mikrostředí, mají největší vliv na prognózu pacienta tumor infiltrující lymfocyty (TIL). Jejich přítomnost navíc nabývá na významu i s rozvojem biologických terapií immune checkpoint inhibitory (ICIs). Stěžejní roli TIL reflektují i nové přístupy v diagnostice nádorů, ilustrované zejména metodou Imunoskóre (dnes používanou v klinické praxi), založenou na kvantifikaci a lokalizaci CD3+ a CD8+ TIL v tenkém řezu nádorovou tkání. Otevřenou otázkou zůstává, nakolik informace získaná z 2D řezu reflektuje skutečnou situaci v inherentně trojrozměrném nádorovém mikrostředí. Je to zejména rozvoj nových metodických přístupů, které usnadňují získání 3D histologické informace je klíčový k zodpovězení této otázky.

V teoretické části této práce je nejdříve nastíněna heterogenita nádorového mikrostředí a role buněk imunitního systému v něm. Na množství příkladů je poté ilustrována role prostorové heterogenity a její případný vliv na histopatologické hodnocení nádoru s důrazem na TIL. Detailně je popsán vývoj, provedení, princip klasifikace a přínosy či nedostatky metody Imunoskóre. Ta je ilustrativním příkladem metody založené na lokalizaci TIL, avšak postrádá informaci o 3D heterogenitě v nádorové tkáni. Dále jsou popsány metodické přístupy aplikované v 3D histologii, zejména s důrazem na projasňování tkáně (z anglického „tissue clearing“), lightsheet mikroskopii a následnou analýzu získaných dat.

Vzhledem k široké paletě metod pro projasnění tkáně bylo v experimentální části této práce otestováno několik z nich (CUBIC, 3DISCO, PACT). S ohledem na nejlepší projasnění tkáně, kompatibilitu se značením a kompatibilitu se zobrazováním v použitém lightsheet mikroskopu byla zvolena jako nejvhodnější CUBIC metoda. Práce popisuje metodické přístupy umožňující optimalizaci značení protilátkami či malými fluorescenčními molekulami s využitím korelace cytometrie a mikroskopie či s využitím semikvantitativní automatické analýzy obrazu v ImageJ. Testovaná byla i alternativní metoda zobrazování projasněných vzorků pomocí strukturované iluminace. Její využití je limitováno na vzorky s nízkým pozadím či malým množstvím značených struktur. Ačkoliv se nepodařilo provést analýzu TIL ve 3D z důvodu nekompatibility protilátek s detekcí TIL v projasněných vzorcích, bylo na alternativně značené tkáni demonstrováno projasnění, barvení, snímání a analýza buněk ve 3D. Tato práce představuje paletu metodických přístupů využitelných při 3D analýze tkání a následném porovnání výstupů 2D a 3D histologie.

## KLÍČOVÁ SLOVA

Imunoskóre, imunitní infiltrát, projasnění tkáně, lightsheet mikroskopie, SPIM, nádorové mikroprostředí, karcinom, pevný nádor.



# ABSTRACT

Solid tumors are complex structures comprising besides the cancer cells vasculature, extracellular matrix (ECM), soluble molecules and a plethora of various other cell types. These components form a so-called tumour microenvironment. From the numerous cell types that are part of tumor microenvironment, tumor infiltrating lymphocytes (TILs) play a major role in patient prognosis. Their presence is also of major importance with regard to new biological therapies based on immune checkpoint inhibitors. Crucial role of TILs is also reflected by the new approaches in cancer diagnostics namely by Immunoscore method (currently used in clinical settings). Immunoscore is based on localization and quantification of CD3+ and CD8+ TILs in thin histological sections of tumor tissue. The question remains to which extent the information obtained from 2D slices reflects the situation in tumor microenvironment considering its spatial heterogeneity. The development of new methodological approaches allowing evaluation of histological information in 3D is the key to answer this question.

The theoretical part of this work first describes the heterogeneity of the tumor microenvironment and the role of immune cells within it. Then, the role of spatial heterogeneity and its possible influence on the histopathological evaluation of the tumor is illustrated with an emphasis on TILs. The development, execution, principle of classification, advantages and shortcomings of the Immunoscore method are described in detail. Immunoscore is an example of a method based on localization of TILs, but still lacking information about 3D heterogeneity in tumor tissue. Methodological approaches applied in 3D histology are described with emphasis on tissue clearing, light sheet microscopy and subsequent analysis of 3D image data.

From a wide variety of methods for tissue clearing, three of them were tested in the experimental part of this work (CUBIC, 3DISCO, PACT). The CUBIC method was selected as optimal due to superior clearing efficiency, compatibility both with labelling and with imaging using the light sheet microscope. The work presents methodological approaches enabling the optimization of labelling with both antibodies and small dyes with the use and correlation of cytometry and microscopy data and with using of semi-quantitative automatic image analysis in ImageJ. Structural illumination was also tested as an alternative method of imaging cleared samples. It was shown that its use is limited to samples with a low background or a small number of labeled structures. Although it was not possible to achieve 3D analysis of TIL due to incompatibility of specific antibodies with imaging of cleared tissue, we have demonstrated clearing, antibody labelling, light sheet imaging and subsequent analysis of cells in 3D on alternatively labelled tissue. This work demonstrates a variety of methodological approaches in 3D tissue analysis useful in the comparison between histological analysis in 2D and 3D.

## KEYWORDS

Immunoscore, immune infiltrate, tissue clearing, lightsheet microscopy, SPIM, tumor microenvironment, carcinoma, solid tumor.

# OBSAH

1	Úvod .....	1
2	Literární přehled.....	2
2.1	Nádorové mikroprostředí .....	2
2.2	Role nádorového mikroprostředí v progresi nádoru.....	2
2.3	Role imunitního systému v progresi nádoru.....	3
2.4	Heterogenita imunitního nádorového mikroprostředí.....	7
2.5	Role morfolgie a prostorové informace v analýze imunitní odpovědi vůči nádoru .....	9
2.6	Protinádorová imunitní odpověď v myším modelu CrCa .....	11
2.7	Stávající histopatologická klasifikace CrCa .....	12
2.8	Kvantifikace T buněk jako prediktivní a prognostický marker CrCa .....	14
2.9	3D histologie .....	21
3	Cíle .....	27
4	Materiál a metodika.....	28
4.1	Materiál .....	28
4.2	Metody .....	33
5	Výsledky .....	51
5.1	Porovnání třech různých projasňovacích protokolů z hlediska efektivity zprůhlednění tkáně a kompatibility s fluorescenčními barvivy .....	51
5.2	Korelace dat z průtokové cytometrie a mikroskopie .....	62
5.3	Detekce CD4+ a TCR-beta+ buněk v projasněné tkáni s využitím běžné mikroskopie ..	66
5.4	Detekce CD4+ a TCR-beta+ buněk v projasněné tkáni s využitím lightsheet mikroskopie	67
5.5	Použití alternativních metod zobrazování pro přípravu vzorků pro lightsheet mikroskopii .....	69
5.6	Segmentace a kvantifikace buněk ve 3D .....	72
5.7	Optimalizace CUBIC protokolu pro barvení protilátkami.....	74
6	Diskuze .....	76
6.1	Výběr vhodné projasňovací techniky.....	76
6.2	Značení projasněných tkání malými molekulami .....	78
6.3	Korelace dat z průtokové cytometrie a mikroskopie .....	80
6.4	Immunohistochemické značení projasněných tkání .....	81
6.5	Zobrazování.....	82
6.6	Analýza dat .....	83
6.7	Úpravy CUBIC protokolu pro lepší penetraci protilátek do vzorku.....	84
7	Závěr .....	86

8	Přílohy .....	88
8.1	Příloha 1: vlastnosti rešeršovaných fluoroforů a jejich zdroje.....	88
8.2	Příloha 2: Makro pro vytvoření segmentační masky pro Imaris v ImageJ .....	90
8.3	Příloha 3: Makro pro tvorbu montáží se zvolenou škálou z vícekanálových snímků a histogramů v celé škále.....	91
8.4	Příloha 4: Makro pro segmentaci kuliček, či splenocytů a následné vytvoření histogramů nasegmentovaných objektů .....	93
8.5	Příloha 5: Makro pro vytvoření grafu průměrné intenzity v různých hloubkách vzorku 95	
8.6	Příloha 6: Makro pro měření průměrné intenzity fluorescence a její směrodatné odchylky ve značených částicích a pozadí pro kvantifikaci staining indexu (SI) .....	97
8.7	Příloha 7: Detailní nastavení funkcí pro analýzu v programu Imaris .....	99
9	Seznam literatury .....	101

# SEZNAM ZKRATEK

APC	Antigen prezentující buňky	Antigen-presenting cells
APD	Lavinová fotodioda	Avalanche photodiode
CCD	Zařízení s vázanými náboji	Charge-coupled device
CMOS	Doplňkový polovodič na bázi kovu a oxidu	Complementary metal-oxide-semiconductor
CrCa	Kolorektální karcinom	Colorectal cancer
CT	Centrum nádoru	Center of tumor
CTL	Cytotoxické T lymfocyty	
DCM	Dichlormetan	
ECM	Extracelulární matrix	
EMT	Epiteliálně mezenchymální tranzice	
FCS	Fetální hovězí sérum	Fetal calf serum
FGF	Fibroblastový růstový faktor	Fibroblast growth factors
GZMB	Granzym B	
ICIs	Checkpoint inhibitory	Immune checkpoint inhibitors
IHC	Imunohistochemie	Immunohistochemistry
IM	Invazní okraj	Invasive margin
IS	Imunitní systém	
LN	Lymfatické uzliny	Lymph nodes
MDSC	Myeloidní supresorové buňky	Myeloid derived supresor cells
NHS	N-hydroxysukcinimid	
PI	Propidium jodid	Propidium iodide
PMT	Fotonásobič	Photomultiplier tube
RT	Pokožková teplota	Room temperature
SDP	Sulfodichlorofenol	
SPIM	Mikroskopie využívající osvit tenké vrstvy vzorku	Single plane illumination microscopy
SW	Software	
TAA	Tumor-asociované antigeny	
TEA	Trietanolamin	
TF	Transkripční faktor	
THF	Tetrahydrofuran	
TIL	Tumor infiltrující lymfocyty	
Treg	Regulační T lymfocyty	
VEGF	Vaskulární endotelový růstový faktor	Vascular endothelial growth factor
WHO	Světová zdravotnická organizace	World Health Organization

# 1 ÚVOD

Tato práce se zabývá metodickými přístupy k výzkumu nádorového mikroprostředí. Zaměřuje se na jeho heterogenitu a komplexitu, jejichž pochopení je klíčové k dalšímu prohloubení znalostí a s tím spojeným pokrokem v diagnostice a léčbě nádorových onemocnění. Podstatnou a heterogenní součástí nádorového mikroprostředí jsou složky imunitního systému, zejména pak lymfocyty, jejichž množství a lokalizace jsou úzce spojeny s rozvojem onemocnění a prognózou pacienta (Angell *et al.*, 2020; Duan *et al.*, 2020).

Analýza množství a lokalizace T lymfocytů (definovaných znakem CD3) a cytotoxických T lymfocytů (definovaných znakem CD8) se stala základem Imunoskóre (Pagès *et al.*, 2018). Jde o diagnostickou metodu navrženou v roce 2006 jako doplněk stávající TNM histologické klasifikace u kolorektálního karcinomu (Galon *et al.*, 2006) dnes mezinárodně validovanou (Pagès *et al.*, 2018) a komercializovanou pro použití v klinice (Angell *et al.*, 2020).

Otevřenou otázkou, kterou se tato práce zabývá, je role prostorové heterogenity imunitního infiltrátu v nádoru. Zejména s ohledem na její vliv při analýze nádorového mikroprostředí z histologických řezů, jako je tomu v případě Imunoskóre. S rozvojem histologických metod umožňujících analýzu tkáně ve 3D, je stále aktuálnější ptát se, jaké množství informace o heterogenním nádorovém mikroprostředí je ztraceno při jeho analýze na několika málo vybraných řezech?

Získání 3D histologické informace dříve vyžadující časově náročné zpracování vzorku a následnou rekonstrukci dat dramaticky zjednodušil nástup dvou nových technologií na přelomu tisíciletí – projasňovacích metod a lightsheet mikroskopie (Glaser *et al.*, 2017; Tainaka *et al.*, 2018). První jmenované jsou metodiky umožňující zprůhlednění velkých vzorků (od několika milimetrů až po celá těla živočichů) a jejich mikroskopickou analýzu bez nutnosti fyzického řezání. Lightsheet mikroskopie pak řádově zrychlila snímání takových vzorků a svojí konstrukční variabilitou otevřela dveře klinické 3D histologii (Glaser *et al.*, 2017; Nojima *et al.*, 2017; Tanaka *et al.*, 2017).

Cílem této práce je výběrem a optimalizací vhodné projasňovací metody, využitím různých způsobů 3D mikroskopie a analýzou trojrozměrných dat demonstrovat aplikovatelnost tohoto postupu pro evaluaci dvourozměrného a třírozměrného přístupu k histologické analýze tumor infiltrujících lymfocytů (TIL) v nádorové tkáni na myším nádorovém modelu a kontrolních tkáních. Vzhledem k aktuálnosti a rychlému vývoji problematiky byly v průběhu vyhotovování této práce publikovány další články zabývající se stejnou problematikou (Chen *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2019). V době začátku práce (rok 2017), však byl tento přístup zcela inovativní a existovaly jen náznaky budoucího využití projasňovacích metod k analýze TIL (Nojima *et al.*, 2017; Tanaka *et al.*, 2017).

## 2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 NÁDOROVÉ MIKROPROSTŘEDÍ

Pevné nádory jsou tvořeny jednak populací samotných nádorových buněk (nádorový parenchym) a zároveň množstvím dalších buněčných i nebuněčných komponent obklopujících samotné buňky nádorové (nádorové stroma). (Connolly *et al.*, 2003; Foster *et al.*, 2018) Termín nádorové mikroprostředí lze do jisté míry zaměňovat s termínem nádorové stroma (Dictionary of Cancer Terms – National Cancer Institute, 2011), který označuje složky nádorové tkáně mimo transformované buňky. V této práci je termínem nádorové prostředí akcentován zejména funkční aspekt, reciprocita a komplexita vztahů mezi transformovanými buňkami a dalšími složkami nádoru (Balkwill *et al.*, 2012; Bhome *et al.*, 2015; Najafi *et al.*, 2019).

Vzhledem k tomu, že detailní rozbor jednotlivých složek nádorového mikroprostředí byl mnohokrát popsán množstvím publikovaných prací i recentních přehledových článků (Binnewies *et al.*, 2018; Duan *et al.*, 2020; Foster *et al.*, 2018; Najafi *et al.*, 2019), bude následovat popis nádorového mikroprostředí z funkčního hlediska, tedy popis mechanismů a složek přispívajících k progresi či naopak zabraňujících růstu nádoru.

### 2.2 ROLE NÁDOROVÉHO MIKROPROSTŘEDÍ V PROGRESI NÁDORU

S progresí nádoru a jeho narůstající velikostí se v důsledku nedostatečné difuze kyslíku stává jeho prostředí hypoxickým a spouští se vaskulogeneze (tvorba nových cév) či angiogeneze (růst cév stávajících) (Balkwill *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2017). Navíc i v malých nádorech ( $\sim 1\text{mm}^3$ ), mikrometastázách, či v nádorech s dostatečnou vaskularizací může docházet ke vzniku hypoxických regionů a spuštění dále popsané signalizace v důsledku dysfunkce přítomné vaskularizace (Gaustad *et al.*, 2017; Li and O'Donoghue, 2008) kterou často provází morfologické abnormality, chaotický růst či zvýšená permeabilita cév (Egeblad *et al.*, 2010; Siemann, 2011). V důsledku hypoxie dochází k produkci fibroblastového růstového faktoru (FGF) případně vaskulárního endotelového faktoru (VEGF) – a to jak stromálními tak nádorovými buňkami zprostředkované signalizací zejména přes transkripční faktory HIF (Hanahan and Weinberg, 2011; Li and O'Donoghue, 2008). I při absenci hypoxie může docházet ke spuštění této signální dráhy v důsledku mutací v onkogenech jako EGFR, Myc, RAF či PI3K (Rak *et al.*, 2000; Shchors *et al.*, 2006) či v důsledku degradace extracelulární matrix (ECM) s navázaným VEGF, kterou způsobují metaloproteázy (Hanahan and Weinberg, 2011).

Mechanismy popsané v předchozím odstavci v mnohém připomínají procesy při hojení ran. V tomto duchu lze na nádor pohlížet jako na ránu, která se nikdy nezahojí (volně přeloženo z originálního termínu „wound that does not heal“), čemuž odpovídají i další procesy přispívající

k jeho progresi (Dvorak, 2015). Jedním z nich je i permanentní aktivace fibroblastů v nádorech (Foster *et al.*, 2018) provázená produkcí a remodelací ECM, produkcí růstových faktorů podporujících proliferaci buněk (Wang *et al.*, 2017) a produkcí proangiogenních faktorů (viz předchozí odstavec).

Dalším faktorem přispívajícím k progresi nádoru je anaerobní metabolismus nádorových buněk. Ten je spuštěn buď v důsledku hypoxie nebo takzvaného Warburgova efektu (Vander Heiden *et al.*, 2009). Anaerobní metabolismus je provázený zvýšeným množstvím laktát dehydrogenázy (enzym konvertující pyruvát na laktát, který je pak aktivně vylučován buňkou do okolního prostředí), což vede ke snížení pH v nádorovém mikroprostředí. Snížené pH má za následek inhibici proliferace a funkce T buněk a také menší efektivitu terapií checkpoint inhibitory (ICIs z anglického „immune checkpoint inhibitors“) (Blank *et al.*, 2016).

Za povšimnutí stojí i role ECM v progresi nádoru. Na rozdíl od dřívějšího pohledu na ECM jako na primárně strukturní složku tkáně se dnes více zdůrazňuje funkční aspekt ECM (Foster *et al.*, 2018; Walker *et al.*, 2018) Je to například výše zmíněná depozice a případné uvolnění růstových faktorů působením metaloproteáz (Hanahan and Weinberg, 2011). ECM dále stimuluje proliferaci nádorových buněk skrz integrinovou signalizaci a napomáhá migraci buněk na základě orientovaného ukládání kolagenových vláken (Foster *et al.*, 2018; Walker *et al.*, 2018). Depozice extracelulární matrix v nádoru či na jeho okraji pak navíc působí i jako fyzická bariéra omezující schopnost lymfocytů infiltrovat tkáň (Salmon *et al.*, 2012) a tím zabraňuje rozvoji efektivní imunitní reakce (Aires *et al.*, 2019).

Kromě výše zmíněné vaskularizace, extracelulární matrix, mezenchymálních buněk a dále podrobněji popsaných buněk imunitního systému hrají důležitou roli i rozpustné molekuly jako cytokiny, chemokiny či paleta růstových faktorů (Fridman *et al.*, 2012). Vzhledem k zaměření práce na buňky imunitního systému v nádorovém mikroprostředí nebudou solubilní faktory dále rozebrány s odkazem na příslušné přehledové články týkající se chemokinů (Mollica Poeta *et al.*, 2019), cytokinů (Landskron *et al.*, 2014) či růstových faktorů (Zhang *et al.*, 2010) a jejich roli v nádorovém mikroprostředí.

## 2.3 ROLE IMUNITNÍHO SYSTÉMU V PROGRESI NÁDORU

V následující kapitole budou popsány vybrané složky imunitního systému, které jsou součástí nádorového mikroprostředí, s důrazem na tumor infiltrující lymfocyty (TIL) a jejich interakci s nádorovými buňkami.

V pevných nádorech můžeme najít všechny typy imunitních buněk vrozené (monocyty a makrofágy, mastocyty, NK buňky, eozinofily a neutrofilové či destičky) i adaptivní imunity (B buňky, NK/T buňky, všechny subpopulace T lymfocytů – regulační, cytotoxické, Th1 či Th2, Tfh či Th17)



(Fridman *et al.*, 2012; Hanahan and Coussens, 2012) které jsou zde ve větším počtu než ve zdravých tkáních (Fridman *et al.*, 2012). Jak bude dále ilustrováno na konkrétních příkladech, lokalizace a počty imunitních buněk i jejich efekt se liší mezi jednotlivými typy nádorů i mezi pacienty (Fridman *et al.*, 2012; Mei *et al.*, 2014).

Z funkčního pohledu má imunitní systém dva protichůdné efekty. Na jednu stranu je schopen účinně eliminovat nádorové buňky a bránit tak progresi nádoru, zároveň však v důsledku tohoto procesu dochází k imunoeditaci zvýhodňující nádorové buňky rezistentní vůči imunitní odpovědi (Greaves and Maley, 2012). Imunoeditace nádorů (prokázaná jak na myších modelech, tak u lidských nádorů) je mutualistický dynamický vztah mezi nádorovými buňkami a buňkami imunitního systému. Tento vztah připomíná přirozený výběr, kdy selekční tlak vyvolaný imunitními buňkami vede k evoluci populací nádorových buněk, které jsou schopné uniknout imunitní odpovědi (buď ji nevyvolávají, nebo jsou vůči ní rezistentní). Právě tyto klony buněk přetrvávají v pacientovi a jsou zodpovědné za další progresi onemocnění (Angelova *et al.*, 2018). Dynamický proces „darwinovské“ selekce odehrávající se v nádoru je jednou z příčin heterogenity nádorového mikroprostředí a to jak v prostoru, tak v čase.

### 2.3.1 MAKROFÁGY, MYELODNÍ SUPRESOROVÉ BUŇKY A DALŠÍ BUŇKY VROZENÉ IMUNITY

Makrofágy a myelodní supresorové buňky (MDSC z anglického „myeloid-derived suppressor cells“) podporují metastáze produkcí TGF-beta který stimuluje epiteliálně mezenchymální tranzici a vaskularizaci (často produkují přímo VEGF) a zároveň produkci dalších cytokinů jako IL-10 přispívají k protizánětlivému prostředí a supresi imunitní odpovědi (Hanahan and Coussens, 2012; Noy and Pollard, 2014). Na roli makrofágů či MDSC a jejich produkce TGF-beta spolu s dalšími faktory (TNF, IL-6, CCL-18) poukazuje i jejich blízkost k invadujícím nádorovým buňkám v invazním okraji *in vivo* (Dongre and Weinberg, 2019).

V případě makrofágů je zejména v relaci k novým imunoterapiím pozoruhodná i jejich schopnost vázat pomocí Fcγ receptoru (alespoň v myším modelu) anti-PD-1 protilátky, odstraňovat je tak z povrchu T buněk a snižovat efekt imunoterapie (Arlauckas *et al.*, 2017). Interakce s makrofágy v nádorovém stroma navíc pravděpodobně vede ke snížené schopnosti CD8+ T buněk migrovat do nádoru a k jejich depleci z centra lidských i myších nádorů (Peranzoni *et al.*, 2018), která je spojena s horší odpovědí na PD-1 terapie. Mezenchymální fenotyp buněk prošlých EMT (často v důsledku působení makrofágů či MDSC) navíc dále přispívá k tvorbě imunosupresivního nádorového mikroprostředí a s tím spojené rezistence vůči imunoterapiím (Dongre and Weinberg, 2019). MDSC pak množstvím mechanismů mezi něž patří deplece L-argininu a cysteinu či degradace L-selektinu narušují metabolismus, aktivaci a migraci T lymfocytů a brání tak rozvoji efektivní T buněčné odpovědi (Ostrand-Rosenberg, 2010).

Dalším typem buněk přirozené imunity jsou neutrofilní granulocyty. Ty mohou přispívat ke stimulaci angiogeneze či vaskulogeneze produkcí MMP-9 a rozkladem ECM deponující VEGF (Hanahan and Coussens, 2012). Ačkoliv hrají neutrofilní granulocyty významnou roli při vývoji nádoru a jsou nejčastějšími buňkami imunitního systému, jejich využití jakožto prognostického znaku omezuje zejména pleiotropie jejich funkcí (Binnewies *et al.*, 2018). Ta zahrnuje škálu pro- a protizánětlivých efektů, z nichž v obou případech může jít jak o pro- tak protinádorové působení (Giese *et al.*, 2019). V závislosti na použitém modelovém systému pak byly navíc u neutrofilů popsány jak efekty stimulující (v MMTV-PyMT myším modelu rakoviny prsu), tak bránící metastázám (4T1 myší model rakoviny prsu) a celou situaci navíc komplikuje i nedostatek biomarkerů umožňujících odlišit jednotlivé populace neutrofilů (Binnewies *et al.*, 2018; Giese *et al.*, 2019).

### 2.3.2 NK BUŇKY

U NK buněk jsou opět rozporuplné výsledky studií. Vzhledem ke schopnosti přímo likvidovat nádorové buňky pomocí perforinů, granzymů, TNF-alfa či TRAIL a FasL jsou NK buňky často spojované s lepší prognózou (Gonzalez *et al.*, 2018). Byly ale publikovány i práce v nichž přítomnost NK buněk nekoreluje s lepší prognózou, což je pravděpodobně důsledkem anergie způsobené přítomností TGF-beta v mikroprostředí nádoru. K rozporuplným výsledkům přispívá i častá definice pomocí CD57 znaku, který se nachází i na aktivovaných cytotoxických buňkách a není pro NK buňky specifický (Fridman *et al.*, 2012).

### 2.3.3 DENDRITICKÉ BUŇKY

Dendritické buňky jsou nezbytné pro rozvoj efektivní protinádorové odpovědi. Představují spojení mezi vrozenou a adaptivní imunitou a jsou nejefektivnějšími antigen prezentujícími buňkami (APC z anglického „antigen-presenting cells“) (Gonzalez *et al.*, 2018). Jejich stěžejní roli v protinádorové imunitní odpovědi potvrzuje i desítky let trvající vývoj vakcín na bázi dendritických buněk nabývajících na významu v kontextu stávajících imunoterapií (Santos and Butterfield, 2018). Vzhledem k zaměření této práce je nutné podotknout, že interakce dendritických buněk (ale i dalších APC) s lymfocyty je podmíněná jejich vzájemnou proximitou. Jde o jeden z důležitých dějů, který v sobě zahrnuje aspekt organizace v prostoru a pro jehož studium je tím pádem nezbytná co nejpřesnější a nezkreslená informace o prostorovém uspořádání. Chang *et al.* (2013) ukázali, že kromě počtu i prostorová organizace (shlukování) dendritických buněk v lymfatických uzlinách koreluje s prognózou pacientů.

### 2.3.4 B LYMFOCYTY

V případě B lymfocytů je u mnoha typů nádorů (melanom, karcinom žaludku, nádor slinivky či vaječníků a další) jejich přítomnost spojena s lepší prognózou, ale existují i nádory

(nemalobuněčný karcinom plic či nádor prostaty) u nichž je vliv těchto buněk rozporuplný (Hendry *et al.*, 2017). Kromě produkce protilátek je pravděpodobným mechanismem protinádorového působení, zejména u CD27- subpopulace paměťových B buněk, prezentace antigenů a kostimulačních molekul TIL a tvorba terciálních lymfoidních struktur (Nielsen *et al.*, 2012). S tím obdobně jako v případě dendritických buněk souvisí význam lokalizace B lymfocytů, respektive jejich kolokalizace s T buňkami, která pozitivně koreluje s pacientovou prognózou (Kroeger *et al.*, 2016).

### 2.3.5 T LYMFOCYTY

T lymfocyty představují funkčně a fenotypicky heterogenní populaci buněk. Th1 či Th2 CD3+CD4+ pomocné T lymfocyty produkují cytokiny, které stimulují buněčnou či humorální odpověď. CD3+CD8+ cytotoxické T lymfocyty jsou schopné likvidace nádorových buněk perforiny a granzymy. Paměťové CD3+CD4+CD45RO+ a CD3+CD8+CD45RO+ T buňky dokáží rychleji a s vyšší amplitudou odpovídat na setkání s antigenem v porovnání s CD3+CD4+ či CD3+CD8+ buňkami, které se setkaly s antigenem poprvé. T regulační buňky (Treg) nejčastěji definované expresí transkripčního faktoru (TF) FoxP3 působí imunosupresivně. Zatímco u cytotoxických a paměťových T buněk je u mnoha druhů nádorů včetně kolorektálního karcinomu (CrCa z anglického „colorectal carcinoma“) jejich přítomnost spojena s lepší prognózou, u dalších subpopulací T buněk je jejich efekt na progresi nádoru daleko rozporuplnější v závislosti na druhu studovaného nádoru, případně se výsledky u jednoho druhu nádoru liší v různých publikacích. (Fridman *et al.*, 2012; Kong *et al.*, 2019)

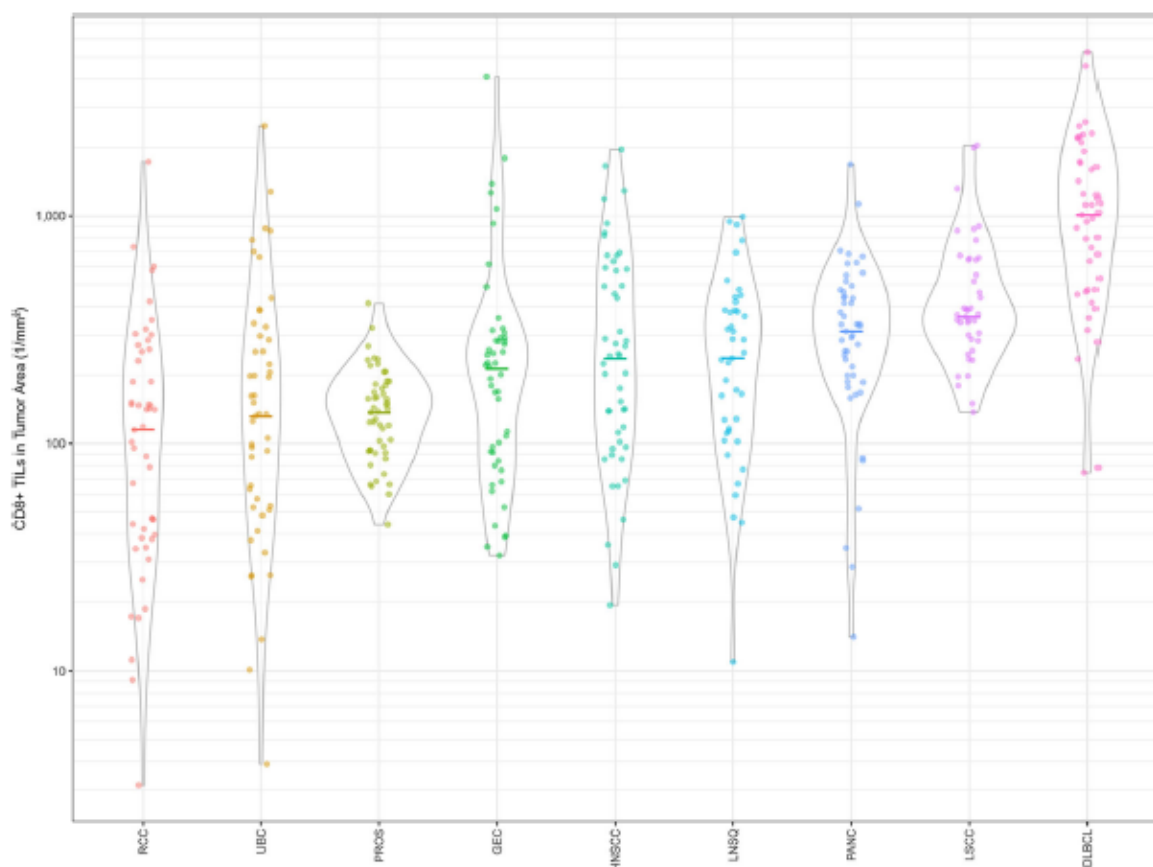
Ani přítomnost CD8+ T buněk ale není spojena s lepší prognózou u všech typů nádorů. Výjimkou je například karcinom ledviny, u kterého je T buněčná infiltrace spojena s horší prognózou, pravděpodobně související s T buněčným vyčerpáním (Angell *et al.*, 2020). Přesto jde o populaci nejvýrazněji spojenou s lepší prognózou přes různé druhy nádorů – analýza 250 prací na 28 různých typech nádorů ukázala pozitivní efekt CD8+ T buněk v 98 % studií (Pagès *et al.*, 2018). U nádorů, v nichž cytotoxické CD8+ T lymfocyty nekorelují s lepší prognózou, může být důvodem jejich produkce cytokinů jako IL-6 či TNF stimulujících epiteliálně mezenchymální tranzici (EMT), jak ukazují *in vitro* i *in vivo* experimenty. Účinnou cytotoxickou odpověď pak inhibuje jednak produkce TGF-beta, ale i větší míra autofágie či horší formování imunologické synapse při kontaktu s cílovými buňkami, které prošly EMT (Dongre and Weinberg, 2019).

Výrazný je rozpor mezi výsledky jednotlivých studií či výsledky u různých nádorů, zejména v případě Treg. Zde může hrát významnou roli nejednoznačná definice samotných Treg, popřípadě jejich subpopulací (Fridman *et al.*, 2012). K rozporuplným výsledkům, nejen v případě Treg, přispívá zejména metodologická nejednotnost prací ve výběru analyzovaných populací, analyzované oblasti nádoru (nádorová tkáň, invazní okraj či stroma, popřípadě jejich kombinace)

či ve způsobu kvantifikace (Mei *et al.*, 2014). Metaanalýza >70 studií zahrnujících sedmnáct typů nádorů potvrdila variabilitu prognózy v závislosti na typu nádoru, ale i v rámci jednoho typu nádoru v závislosti na jeho progresi (Shang *et al.*, 2015).

## 2.4 HETEROGENITA IMUNITNÍHO NÁDOROVÉHO MIKROPROSTŘEDÍ

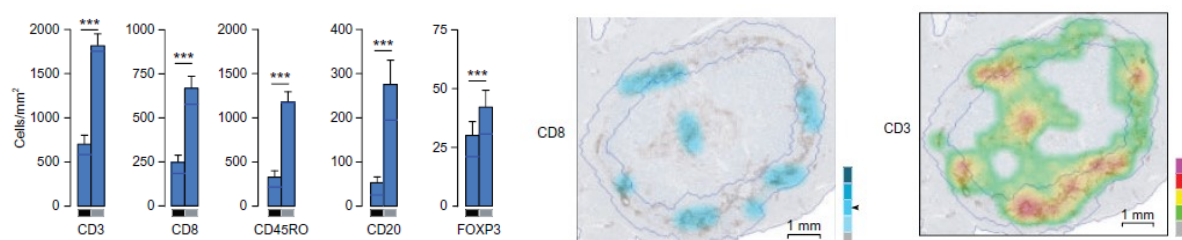
Komplexitu a heterogenitu nádorového prostředí lze v nádorovém prostředí rozeznávat na více úrovních, či na ně nahlížet z více pohledů. Nádorové mikroprostředí je tvořeno desítkami různých buněčných populací a nebuněčných složek s násobně složitější sítí interakcí mezi nimi (da Cunha *et al.*, 2019). Připomíná tak složitý ekosystém a lze jej popisovat obdobným způsobem jako v populační ekologii interakce společenstev (Nawaz and Yuan, 2016). Další úroveň komplexity představuje heterogenita mezi jednotlivými typy nádorů a zároveň i mezi jedním typem nádoru u různých pacientů, viz obr. 1 ilustrující tento fakt na počtech CD3+CD8+ cytotoxických T lymfocytů (Steele *et al.*, 2018; Van den Eynde *et al.*, 2018).



Obr. 1: Heterogenita v denzitě (počet buněk na mm<sup>2</sup>) cytotoxických TIL v rámci jednotlivých typů nádorů i mezi nimi. Zleva renální karcinom, karcino močového měchýře, karcinom prostaty, gastroezofageální karcinom, karcinom hlavy a krku, neskvamózní nemalobuněčný karcinom plic, karcinom slinivky, skvamózní nemalobuněčný karcinom plic a difuzní B-buněčný lymfom. Upraveno podle (Steele *et al.*, 2018).

Heterogenitu lze pozorovat dokonce i v rámci jednoho nádoru u jednoho pacienta v závislosti na čase či lokalizaci nádoru a jeho metastáz (Van den Eynde *et al.*, 2018). Tento fakt ilustruje i studie v níž Angelova *et al.* (2018) jedenáct let kontinuálně sledovali rozvoj nádoru a jeho metastáz u jednoho pacienta. Odlišnosti v genomu, v odpovědi na terapii i ve skladbě imunitní odpovědi mezi „mateřskou“ a „dceřinými“ metastázemi, tedy mezi stejnými populacemi buněk v různých časech či místech ilustrují heterogenitu nádoru, jejíž původ je nutné hledat v dynamické evoluci nádorových buněk v kontextu ostatních složek nádorového mikroprostředí (Angelova *et al.*, 2018; Yuan, 2016). Bindea *et al.* (2013) pak toto ilustrují v případě kolorektálního karcinomu (CrCa z anglického „colorectal carcinoma“) systémově biologickou studií v níž mapují, jak se v čase mění počty jednotlivých populací buněk (zejména pokles většiny populací T buněk, ale i nárůst počtu B buněk v terminální fázi) infiltrujících nádor během jeho progresu od počáteční (T1) až do terminální fáze (T4).

Na úrovni jednoho nádoru či ohniska metastázy u konkrétního pacienta lze pozorovat i do nedávna přehlíženou avšak podstatnou heterogenitu v lokalizaci složek nádorového mikroprostředí (Yuan, 2016), mimo jiné v lokalizaci imunitních buněk, ať už mezi invazním okrajem a centrem nádoru či v každé z těchto oblastí (viz obr. 2) (Mlecnik *et al.*, 2018). Prostorovou heterogenitu ilustruje i existence zdánlivě protichůdných oblastí v rámci jednoho nádoru, například simultánní přítomnost vaskularizace a hypoxických regionů v tomtéž nádoru (Yuan, 2016). Zachycení této heterogenity, které umožňují pouze zobrazovací metody na úrovni jednotlivých buněk (zejména mikroskopie), je stěžejní pro diagnostiku (Heindl *et al.*, 2015). To ostatně nejlépe ilustruje i to, že nejpoužívanější prognostickou metodou je i přes rozvoj rozličných -omických přístupů, stále klasická histologie založená na hodnocení nádoru zejména na základě morfologických kritérií (v detailu popsáno dále).



Obr. 2: Heterogenita v densitě imunitních buněk v invazním okraji a centru nádoru (CrCa). Vlevo signifikantní rozdíl mezi počty jednotlivých imunitních buněk v centru metastázy (sloupce nalevo) a v jejím invazním okraji (sloupce napravo), vpravo mapa hustoty CD3+ a CD8+ buněk v rámci jednoho řezu metastáz. Upraveno podle Mlecnik *et al.* (2018).

Kromě role lokalizace CD3+ či CD8+ lymfocytů, která bude podrobně popsána v samostatné kapitole o Imunoskóre, existuje i množství dalších příkladů dokazujících roli prostorového

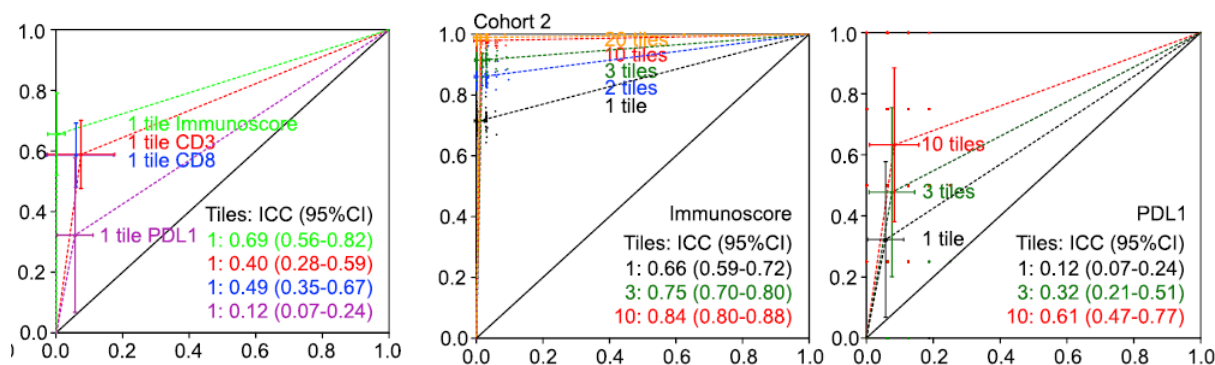
rozmístění imunitních buněk v nádoru zmíněných v předchozí kapitole. Shlukování dendritických buněk samo o sobě koreluje s dobou do regrese onemocnění v případě rakoviny prsu (Chang *et al.*, 2013). Korelace folikulárních pomocných T buněk (definované jako CXCR5+) u CrCa s prognózou byla opačná. Horší prognóza byla spojená s jejich lokalizací v invazním okraji, naopak lepší s jejich přítomností v centru nádoru (Bindea *et al.*, 2013). V případě interakce Treg a cytotoxických T buněk (CTL z anglického „cytotoxic T lymphocytes“) Feichtenbeiner *et al.* (2014) objevili rozsah takzvané funkční vzdálenosti (30 – 130  $\mu\text{m}$ ) v případě infiltrace nádoru žaludku. Kolokalizace těchto buněk na tuto vzdálenost pak korelovala s výrazným zlepšením patientské prognózy (10leté přežití 89 % versus 55 % u pacientů, jejichž buňky se nacházely v jiných vzdálenostech).

## 2.5 ROLE MORFOLOGIE A PROSTOROVÉ INFORMACE V

### ANALÝZE IMUNITNÍ ODPOVĚDI VŮČI NÁDORU

Vzhledem k tomu, že vzájemná pozice buněk a jejich poloha je inherentně spjatá s interakcí mezi lymfocyty a buňkami nádoru, klasická histologická analýza 2D řezů má jen omezenou vypovídající hodnotu o vztahu mezi imunitním systémem a nádorovou tkání (Hong *et al.*, 2019; Uhlén and Tanaka, 2018). S heterogenitou nádorového mikroprostředí koreluje potřeba analyzovat co možná největší objem nádorové tkáně pro přesnou diagnostiku, jak ilustruje práce, ve které na široce využívaném markeru Ki67 Besusparis *et al.* ukázali na nutnost analyzovat větší množství tkáně v případě heterogenity nádoru, pro dosažení obdobné přesnosti při diagnostice (Besusparis *et al.*, 2016).

Angelova *et al.* (2018) a Van den Eynde *et al.* (2018) také upozorňují na omezenou vypovídající hodnotu analýzy jediné biopsie vzhledem k heterogenitě subpopulací nádorových buněk i v rámci jednoho nádoru, nebo v rámci různých metastáz pocházejících z totožného nádoru. Tato tvrzení implikují, že pro zpřesnění diagnostiky je nezbytné zpracování většího množství tkáně než pouze vybraného „reprezentativního“ vzorku tkáně v podobě jedné biopsie či jednoho řezu. Van den Eynde *et al.* (2018) to ilustrují na analýze jak Imunoskóre, tak PD-1L (viz obr. 3), kdy zejména u PD-L1 vede použití většího množství materiálu ke zpřesnění testu.



Obr. 3: Porovnání sensitivity (osa Y) a specificity (osa X) testování denzity CD3, CD8, PDL1 či stanovení Imunoskóre na jedné či více náhodně vybraných „biopsiích“ v porovnání se skutečnou denzitou/Imunoskóre na celém řezu tkáně. Upraveno podle Van den Eynde et al. (2018).

Nutnost analyzovat co největší množství materiálu zmiňují i Mlecnik *et al.* (2018) a to s ohledem na analýzu lymfatických uzlin, kde má největší vypovídající hodnotu uzlina pacienta s nejmenším množstvím imunitních buněk. Pro využití v diagnostice či klinických studiích by naopak největší přínos měla analýza všech uzlin místo několika náhodně vybraných, což je se stávajícími histologickými metodami logisticky a metodicky náročné (Mlecnik *et al.*, 2018). Metodika umožňující analýzu celých uzlin bez nutnosti tvorby fyzických řezů by pak mohla umožnit analýzu většího množství materiálu a zpřesnění diagnostiky. S analýzou lymfatického systému souvisí i práce zabývající se korelací denzity lymfatických cév v invazním okraji (ale nikoliv v centru nádoru) s lepší prognózou, respektive rizikem metastáz. (Mlecnik *et al.*, 2016b) Právě v analýze lymfatických či krevních cév je potenciální přínos 3D histologie velice významný (metodám 3D histologie je věnovaná samostatná kapitola dále), vzhledem k tomu že právě dvourozměrná reprezentace cévního systému je výrazně ovlivněná pozicí a orientací řezu trojrozměrnou sítí cév (Liang *et al.*, 2016).

Příkladem toho, jak zkreslující může být hodnocení parametrů zahrnujících morfologii tkáně (tj. i polohu či denzitu buněk) v případě využití 2D řezů je ukázána v další studii (Bronsert *et al.*, 2014). Zde autoři ukázali, že v případě kvantifikace izolovaných ložisek nádorové tkáně v blízkosti invazního okraje, tvořených jen několika buňkami (v anglickém originále „tumor buds“) je většina těchto struktur pouze artefaktem 2D analýzy (78 - 91 % těchto struktur jsou ve skutečnosti neizolované výběžky primárního nádoru, jeví se jako izolovaná ložiska v důsledku polohy 2D řezu).

Obdobným příkladem ztráty informace při využití 2D řezů k diagnostice na základě histologie je práce Glassera *et al.*, ve které dva patologové hodnotili Gleasonovo skóre (systém stratifikace pacientů na základě histologického hodnocení diferenciací buněk na několika bioptických řezech) karcinomu prostaty nejdříve na základě klasických 2D řezů a poté na základě 3D rekonstrukce

celého objemu tkáně získaného biopsií (2 x 1 mm). Autoři zde ukázali, že stanovení Gleasonova skóre (6 či 7) je závislé na tom, jaký řez tkáně je právě hodnocen, a navíc, že mezi jednotlivými patologi nepanuje ani 50% shoda v případě hodnocení jednotlivých řezů. V případě, kdy měli patologové k dispozici 3D rekonstrukci celé biopsie, shodovali se v hodnocení (Gleasonovo skóre 6) a navíc se ukázalo, že struktury, které vedly k opačnému hodnocení (Gleasonovo skóre 7), byly pouze artefaktem vybraného 2D řezu trojrozměrnou strukturou. (Glaser *et al.*, 2017)

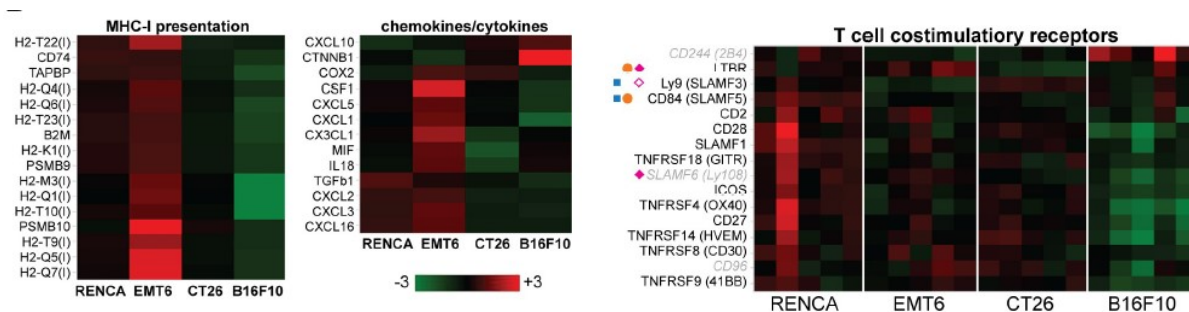
## 2.6 PROTINÁDOROVÁ IMUNITNÍ ODPOVĚĎ V MYŠÍM MODELU CRCA

Využití modelových systémů a organismů, je stěžejní součástí vývoje a validace nových diagnostických i terapeutických postupů (Evans *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2018). Vzhledem k nízké frekvenci spontánního vzniku CrCa v myších, jsou modely tohoto onemocnění založené na indukci nádoru buď podáním karcinogenních látek, využitím genového inženýrství či implantací lidské či myší nádorové linie buněk (Evans *et al.*, 2016). Chemicky indukované myší nádory často rekapitulují molekulární mechanismy karcinogeneze u lidí. Nevýhodou je zejména časová náročnost indukce takového nádoru (řádově desítky týdnů). Obdobná je situace i u modelů vytvořených genovým inženýrstvím, které nejvěrněji rekapitulují vývoj nádoru včetně heterogenity v nádorovém mikroprostředí. Jejich použití však omezují náklady na vývoj a dostupnost takových modelů. Nádory vyvolané implantací myších nádorových linií buněk pak mají výhodu zejména díky nízkým nákladům a rychlému růstu nádoru, v případě heterotopických subkutánních modelů navíc umožňují i snadný monitoring růstu nádoru a jeho následnou resekci. (Evans *et al.*, 2016; John and Said, 2017)

V této práci byla využívána CT26 nádorová linie odvozená od BALB/c syngenního nediferencovaného (grade IV.) vysoce metastatického karcinomu střeva indukovaného N-Nitroso-N-methylurethanem (Griswold and Corbett, 1975). Výrazným rozdílem mezi skutečným onemocněním a syngenními modely (jak CT26, tak dalšími) je téměř exkluzivní lokalizace imunitních buněk včetně CD8+ CTL v invazním okraji nádoru u myších modelů, což je v kontrastu s přítomností těchto buněk jak v invazním okraji, tak v centru nádoru u člověka. Důvodem je pravděpodobně mnohonásobně rychlejší růst nádoru v myši (v případě CT26 jde o zdvojení objemu každé 4 dny), než v případě skutečného onemocnění (Yu *et al.*, 2018). Dalším rozdílem je průměrné množství mutací, které je v případě CT26 myšího nádoru 75 mutací na milion párů bází, v případě CrCa jsou to 4 mutace (Castle *et al.*, 2014). Vzhledem k absenci mutací v genech zajišťujících opravu chybného párování mimikuje CT26 MSI-negativní nádory (Castle *et al.*, 2014). To odpovídá většině (asi 80 – 85%) případů CrCa, ovšem negativně to koreluje s imunogenicitou nádoru (Nojadeh *et al.*, 2018). To může být, spolu s rychlým růstem nádoru, dalším důvodem nízkého počtu imunitních buněk v myším nádorovém modelu.



CT26 linie buněk má sníženou produkci cytokeratinů 8 a 18 a zvýšenou expresi vimentinu, což je typickým znakem EMT a koresponduje se zvýšenou schopností invaze (Kwan *et al.*, 2015). Vůbec nejexprimovanějším genem je gp70, který zároveň patří mezi tzv. tumor-asociované antigeny (TAA) a může být terčem cytotoxických lymfocytů (Castle *et al.*, 2014). V porovnání s dalšími syngenními myšími nádorovými liniemi (RENCA, EMT6, B16F10), má CT26 průměrnou expresi jak MHC-I molekul, tak kostimulačních molekul T buněk a mírně zvýšenou expresi některých prozánětlivých cytokinů či chemokinů (viz obr. 4).



Obr. 4: Relativní exprese genů spojených s prezentací proteinů na MHC-I molekulách (vlevo), relativní exprese vybraných chemokinů či cytokinů (uprostřed) a relativní exprese kostimulačních molekul T buněk (vpravo) analyzované RNA sekvenací čtyř myších nádorových linií (RENCA, EMT6, CT26, B16F10). Upraveno podle Yu *et al.* (2018).

Ze zmíněných linií jsou nádory pocházející z CT26 linie jediné, u kterých populace cytotoxických buněk s růstem nádoru neklesá a podíl CD3+CD8+ CTL zůstává u nádorů nad 500 mm<sup>3</sup> mezi 2-3 %, zatímco u ostatních nádorů nad 500 mm<sup>3</sup> klesá pod 1 %. Většina CTL zůstává lokalizovaná v invazním okraji v důsledku rychlého růstu nádoru a pravděpodobně i v důsledku ukládání ECM v jeho okraji, která brání migraci buněk (Yu *et al.*, 2018).

Myší model (kmen C57Bl/6) byl využit i při vývoji Imunoskóre metody (viz dále), kdy autoři využili ortotopického modelu vytvořeného injekcí MC38 nádorové linie do divokého typu myši, či myši s depletovanými cytotoxickými (CD8+) buňkami (Mlecnik *et al.*, 2016b). Rychlejší růst nádoru v myších s depletovanými cytotoxickými buňkami potvrdil jejich roli v redukci progresu CrCa. Ačkoliv zejména ektopické myší modely nerekapitulují lidská onemocnění ve všech aspektech, objasnění jejich biologie je samo o sobě přínosné vzhledem k jejich podstatné roli v primárním výzkumu i testování terapeutik (Binnewies *et al.*, 2018).

## 2.7 STÁVAJÍCÍ HISTOPATOLOGICKÁ KLASIFIKACE CRCA

Stávajícím diagnostickým postupem u CrCa je TNM klasifikace (z anglického tumor, node, metastases) založená na určení velikosti nádoru, zasažení regionálních lymfatických uzlin a přítomnosti vzdálených metastáz. Na základě těchto tří parametrů je stanoven rozsah nádoru („stage“) a rozhodnuto o terapeutickém postupu. Ačkoliv postupně aktualizovaná, je tato desítky

let stará metodika založená primárně na předpokladu že progresi nádoru vychází z vlastností transformovaných buněk a nezahrnuje v sobě interakci s okolní tkání a nádorovým mikroprostředím včetně imunitních buněk (Angell *et al.*, 2020; Galon *et al.*, 2014).

Zejména prediktivní schopnost TNM klasifikace ve vztahu k adjuvantní terapii je nedostatečná, protože u velké části stage II a stage III pacientů nemá podání chemoterapeutik pozitivní efekt (Brenner *et al.*, 2014). Na druhou stranu u 20 – 25 % z pacientů bez vzdálených metastáz či metastáz v lymfatických uzlinách (tito jsou běžně léčeni jen pomocí chirurgie bez následné adjuvantní terapie) dojde k relapsu onemocnění (Galon *et al.*, 2014; Pagès *et al.*, 2009). To ukazuje na skupinu pacientů kteří mají vyšší riziko relapsu (a mohli by profitovat z následné terapie), jenž není detekovatelné pomocí stávající klasifikace, ale kteří by mohli být odhaleni pomocí analýzy imunitní odpovědi v nádoru (Fridman *et al.*, 2012).

Přítomnost imunitní odpovědi může být analyzovaná ze standartně využívaných řezů značených hematoxylinem a eosinem. Na těchto řezech lze například na základě morfologie jader odlišit a následně lokalizovat či kvantifikovat lymfocyty (Heindl *et al.*, 2015). Co však v takovém případě chybí je funkční odlišení jednotlivých subpopulací imunitních buněk. Například různé populace lymfocytů či makrofágů budou mít, v závislosti na funkční orientaci, rozdílný až opačný vliv na progresi nádoru (Galon *et al.*, 2014; Heindl *et al.*, 2015) a subjektivní semikvantitativní analýza přítomnosti TIL nemusí ve velké části případů odpovídat účinné cytotoxické odpovědi (Pagès *et al.*, 2018).

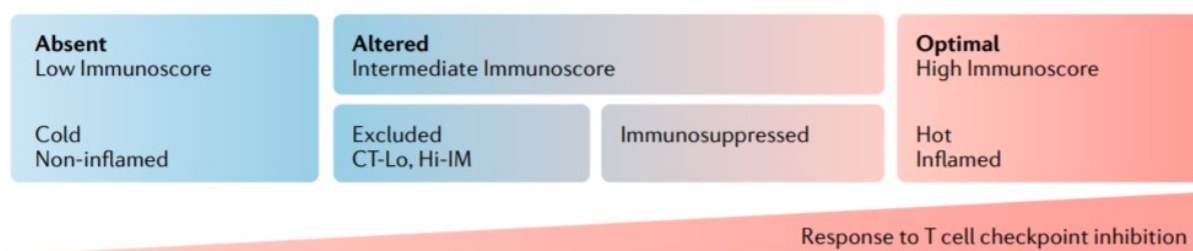
Kromě histologické klasifikace se používá i molekulární klasifikace, mimo jiné na základě mikrosatelitární nestability („MSI status“). Pacienti s mikrosatelitární nestabilitou mají větší množství mutací a tím i potenciálních neoantigenů, asociovaných s infiltrací imunitními buňkami a nízkým rizikem rozvoje metastáz (Angell *et al.*, 2020). Vzhledem k histologicky orientovanému obsahu této práce a tomu, že molekulární klasifikace CrCa v kontextu klinického použití je ještě stále předmětem vývoje (Becht *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2019), bude tato dále zmíněna jen v kontextu Imunoskóre.

### 2.7.1 KLASIFIKACE ZAHRNUJÍCÍ IMUNITNÍ BUŇKY V NÁDOROVÉM MIKROPROSTŘEDÍ

Jak bylo podrobně rozebráno v kapitole o nádorovém mikroprostředí, masa nádoru je vždy do určité míry tvořena (často i z většiny) netransformovanými buňkami. To na jednu stranu znamená komplikaci zejména kvantitativních molekulárních analýz DNA či RNA nádorových buněk v podobě „kontaminace“ materiálem z netransformovaných buněk. Na straně druhé cílená analýza složek nádorového mikroprostředí poskytuje další informaci umožňující lepší předpověď rozvoje onemocnění, vzhledem k tomu, že progresi nádoru inherentně závisí na interakci mezi

samotnými transformovanými buňkami a okolím. (Galon *et al.*, 2014; Hanahan and Weinberg, 2011)

Jednou z navržených klasifikací nádorů je jejich dělení na takzvané „cold“ – studené, bez zánětlivé imunitní odpovědi s minimem TIL a „hot“ – horké, v nichž probíhá aktivní imunitní odpověď a mají velké množství TIL. Mezi těmito kategoriemi pak leží nádory, které obsahují imunitní buňky, které jsou suprimované („immunosuppressed“), či nádory, do nichž nemohou imunitní buňky proniknout vzhledem k fyzické bariéře obklopující nádorovou masu („excluded“) (Galon and Bruni, 2019). Tato kategorizace odráží imunitní odpověď a umožňuje i predikci odpovědi na imunoterapie. Pro aplikaci v klinické praxi, ale chybí jasná definice těchto kategorií a dále rozebírané Imunoskóre ji do velké míry nahrazuje (viz obr. 5). (Angell *et al.*, 2020; Galon and Bruni, 2019)



Obr. 5: Schéma překryvu „hot/cold“ kategorizace a Imunoskóre kategorizace ve vztahu k odpovědi na imunoterapie. Převzato z (Galon and Bruni, 2019).

Na rozdíl od vlastností samotných nádorových buněk (chromozomální nestabilita či mutace v „cancer-driver“ genech, které nesou mutaci přispívající k proliferaci nádorových buněk (Nono *et al.*, 2019)), které jsou velmi heterogenní mezi jednotlivými nádory, přítomnost či intenzita imunitní reakce zrcadlí celkovou biologii daného nádoru v celé její heterogenitě a zároveň je i klíčová pro zpomalení další progresu. Tento princip funguje přes většinu nádorů bez ohledu na konkrétní a mezi nádory heterogenní příčinu rozvoje nemoci. (Mlecnik *et al.*, 2016b)

Bindea *et al.* (2013) publikovali systémově-imunologickou studii, ve kterém sledovali vývoj imunitní odpovědi v čase (z pohledu vývoje nádoru, tedy od T1 do T4) a ukázali, že buňky adaptivní imunity mají (spolu s makrofágy) největší denzitu a zároveň jsou nejvýrazněji (nejvyšší HR) spojené s lepší prognózou.

## 2.8 KVANTIFIKACE T BUNĚK JAKO PREDIKTIVNÍ A PROGNOTICKÝ MARKER CRCA

### 2.8.1 IMUNITNÍ INFILTRÁT NÁDORU A IMUNOSKÓRE

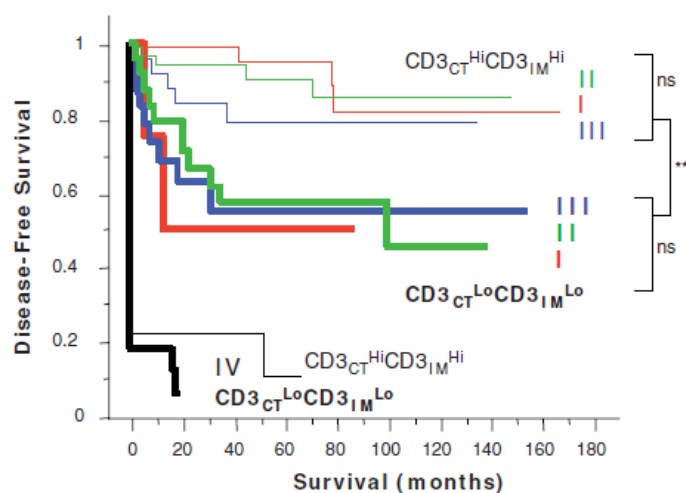
Imunoskóre je metoda která má za cíl charakterizaci nádoru v kontextu imunitní odpovědi, avšak při zachování aspektů nutných pro využití v klinice. To znamená zejména: jednoduchost, finanční

nenáročnost, reproduibilitu napříč pracovišti, benefit pro pacienta a biologickou relevanci (Galon *et al.*, 2012). Na jedné straně tak stojí komplexní imunitní prostředí nádoru (popsané v kapitole o nádorovém mikroprostředí) a na druhé co možná nejjednodušší informace pro lékaře (umožňující stratifikaci čili zařazení pacienta do jedné z předem stanovených prognostických kategorií na jejichž základě je zvolen terapeutický postup).

## 2.8.2 VÝVOJ METODIKY A CHARAKTERIZACE IMUNOLOGICKÉHO KONTEXTU V NÁDORU

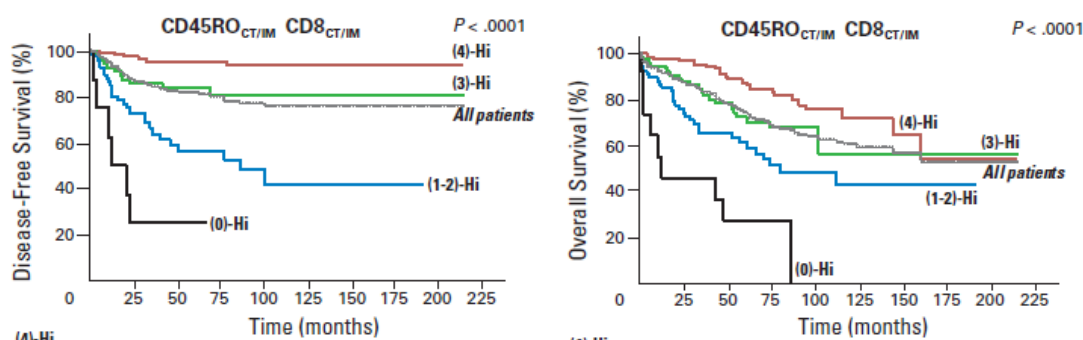
Prvotním podnětem pro výzkum role TIL u CrCa a pozdější vývoj Imunoskóre metodiky byly studie (Galon *et al.*, 2006; Pagès *et al.*, 2005) zaměřené na korelaci mezi prognózou pacienta, počínající metastázou a imunitní odpovědí na nádor. Pomocí kombinace rtPCR (kvantitativní polymerázová řetězová reakce) analýzy 75 vzorků a cytometrické analýzy 39 vzorků CrCa ukázali autoři pozitivní korelaci mezi lepší prognózou pacientů, absencí počínající metastázy, infiltrací zejména T lymfocyty a znaky Th1 buněčné odpovědi (TBX21, IRF1, IFN $\gamma$ , CD3, CD8, granulysin a GZMB), avšak žádnou souvislost mezi znaky imunosuprese nebo zánětů. Navíc i další práce z téže doby poukazyvaly na spojení cytotoxické odpovědi a přítomnosti CD8<sup>+</sup> T lymfocytů s lepší prognózou u pacientů s CrCa (Diederichsen *et al.*, 2003; Guidoboni *et al.*, 2001; Naito *et al.*, 1998).

Na základě těchto informací analyzovali autoři 415 CrCa pomocí imunohistochemie (IHC) vždy pro jeden znak odpovídající populaci T buněk (CD3), cytotoxické odpovědi (CD8 a GZMB) či populaci paměťových T buněk (CD45RO) a ukázali, že vyšší počet buněk pozitivních na CD8, nebo CD3, nebo CD45RO signifikantně koreluje s lepší prognózou pacientů. Přesnost stratifikace pacientů (na základě DSF a OS) se ještě zlepšila, pokud byl počet imunitních buněk analyzován zvlášť v invazním okraji a centru nádoru, než pokud nebyla zahrnuta lokalizace buněk vzhledem k nádoru (Galon *et al.*, 2006). Multivariační analýza v téže studii ukázala, že stratifikace na základě CD3<sup>+</sup> buněk odráží prognózu pacientů lépe než klasická TNM klasifikace, která při rozdělení na základě imunitního infiltrátu již není mezi skupinami s TNM I-III signifikantní (viz obr. 6).



Obr. 6: Stratifikace pacientů s CrCa ilustrovaná Kaplan-Meierovými křivkami přežití u pacientů s CrCa. Barevně jsou odlišeny kategorie pacientů na základě TNM-klasifikace. Sílou křivky jsou odlišeny kategorie pacientů s nízkým (silné křivky,  $CD3_{CT}^{Lo}CD3_{IM}^{Lo}$ ) či vysokým (slabé křivky,  $CD3_{CT}^{Hi}CD3_{IM}^{Hi}$ ) infiltrátem imunitních buněk. Upraveno podle Galon et al. (2006).

V navazující práci Pagès *et al.* (2009) potvrdili, že v nádorech s vyšším množstvím CD45RO+ buněk je signifikantně vyšší exprese genů spojených s Th1 a s cytotoxickou imunitní odpovědí (nikoliv však s Th2 či zánětlivou). Paměťové buňky mohou přetrvávat v těle pacienta a zajistit likvidaci případných cirkulujících buněk či počínajících metastáz. Přestože počet paměťových buněk koreluje s cytotoxickou odpovědí, je u skoro poloviny pacientů (46 %) rozdíl v míře infiltrace cytotoxickými a paměťovými buňkami (pacient má mnoho paměťových buněk a málo cytotoxických či naopak). Pro zahrnutí jednak cytotoxické odpovědi v místě nádoru (vysoký/nízký počet CD8+ T buněk), existence imunologické paměti (vysoký/nízký počet CD45RO+ buněk) a zároveň lokalizace buněk (centrum/invazní okraj nádoru), vytvořili Pagès *et al.* (2009) kategoriální skórovací systém. Ten zahrnuje výše uvedené parametry a byl vytvořený dle následující logiky: vysoký počet daného typu buněk v dané oblasti nádoru = 1, nízký počet daného typu buněk v dané oblasti nádoru = 0. Součet těchto čtyř cifer (CD8 či CD45 v invazním okraji či centru nádoru) = imunitní skóre nabývající hodnot od 0 do 4, kdy 0 znamená nízkou infiltraci jak CD8+ tak CD45RO+ buněk v obou oblastech, 4 znamená vysokou imunitní infiltraci jak CD8+ tak CD45RO+ buněk v obou oblastech. Klinickou relevanci takového skórovacího systému potvrdili Pagès *et al.* (2009) na 602 pacientech v raném stádiu CrCa (TNM I a II), jak ilustrují křivky přežití pacientů v jednotlivých kategoriích (viz obr. 7).



Obr. 7: Kaplan-Meierovy křivky doby do znovuobjevení nemoci (vlevo) a přežití (vpravo) pro pacienty s různým imunitním skóre od nejnižšího ((0)-Hi – černá křivka) po nejvyšší ((4)-Hi – červená křivka). Upraveno podle Pagès et al. (2009).

Porovnání imunitního skóre u nádorů rozdělených na základě standardní TNM klasifikace, potvrdilo že s postupnou progresí nádoru (T1 – T4) klesá infiltrace imunitními buňkami a zejména, že přítomnost koordinované imunitní odpovědi (vysoký počet CD8+ jak v centru nádoru (CT) tak v invazním okraji (IM)) převažuje u pacientů s nádory v brzké fázi (60% pacientů v T1

fázi), zatímco kompletní absence takové odpovědi převažuje v pozdějších fázích rozvoje nádoru (Mlecnik *et al.*, 2011). Spolu s tím nekoordinovaná imunitní odpověď (vysoký počet buněk v jedné oblasti nádoru a nízký v druhé) nediskriminovala mezi nádory v různých fázích progresu. To ukazuje na důležitost prostorově koordinované imunitní odpovědi, která brání (či jejíž absence přispívá k) rozvoji nádoru. Nejenže přítomnost či nepřítomnost koordinované imunitní odpovědi souvisí s progresí nádoru, respektive tato (hodnocena pomocí TNM klasifikace) je na ní závislá, ale zároveň souvisí i s pravděpodobností návratu onemocnění (Galon *et al.*, 2006; Mlecnik *et al.*, 2011).

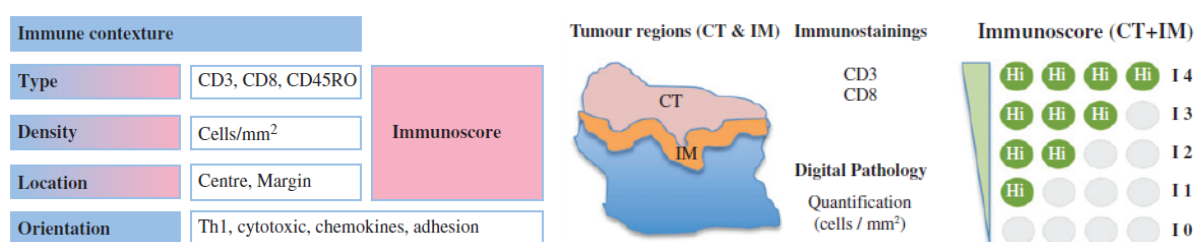
Vzhledem k tomu, že příčinou většiny úmrtí na rakovinu jsou metastázy a nikoliv primární nádor, Mlecnik *et al.* (2016b) se zaměřili na vztah mezi imunitní (cytotoxickou) odpovědí a pravděpodobností rozvoje metastáz. Za prvé ukázali, že cytotoxická odpověď spolu s vysokým imunitním skóre a přítomností lymfatických cév jsou spojeny s nižším rizikem metastáz (zatímco v mutacích v anti- či onkogenech jako TP53, KRAS, PTEN či APC nebyly mezi nádory z pacientů s metastázami či bez nich rozdíly). Za druhé expresní analýza nádorů pak potvrdila, že zatímco rozdíly v genech asociovaných s růstem nádoru jsou marginální, největší rozdíly v expresi mezi metastatickými a nemetastatickými nádory jsou v genech spojených s imunitní (zejména T buněčnou) reakcí. Navíc analýza primárních nádorů s či bez znaků počínající metastázy ukázala, že nižší počet CD3+, CD8+, CD45RO+ a CD4+ buněk v invazním okraji (ale nikoliv v centru nádoru) a nepřítomnost lymfatických cév jsou spojeny s počátkem metastazování. Z toho lze usuzovat, že absence imunitní reakce či schopnost buněk jí uniknout příčinně předchází vzniku metastáz.

Zajímavá je pak i situace v samotných ohniscích metastázy, které je možné analyzovat stejným způsobem jako primární nádory (i ony jsou infiltrované imunitními buňkami a lze u nich morfologicky odlišit invazní okraj a centrum) (Angelova *et al.*, 2018; Van den Eynde *et al.*, 2018). Výraznější imunitní infiltrát v metastázách (zejména pak v té nejméně infiltrované) koreluje s celkově menším počtem metastáz a zároveň s větším imunitním skóre primárního nádoru a s lepší prognózou pacientů ve IV. stádiu nemoci (Van den Eynde *et al.*, 2018) a s vyšší pravděpodobností odpovědi na chirurgickou či radiologickou terapii (Mlecnik *et al.*, 2018).

Ve stejném roce se ti samí autoři zaměřili na nádory s poškozeným aparátem pro opravu chybného párování DNA (MSI-pozitivní z anglického „microsatellite instability“), které obsahují větší množství cytotoxických a paměťových T buněk zajišťujících specifickou odpověď vůči nádoru díky většímu množství potenciálních cílů imunitní reakce – neoepitopů – vzniklých v důsledku posunových mutací (Guidoboni *et al.*, 2001; Le *et al.*, 2015; Mlecnik *et al.*, 2016a). Právě vyvolaná imunitní odpověď signifikantně ovlivňuje přežití pacientů. MSI-pozitivní pacienti měli lepší prognózu jen pokud měli vysoké imunitní skóre a naopak i pacienti MSI-negativní (bez

mikrosatelitární nestability, tito mají běžně horší prognózu) měli lepší prognózu v případě přítomnosti imunitní odpovědi (Mlecnik *et al.*, 2016a).

Dohromady poznatky z těchto studií potvrzují důležitý a klinicky relevantní vztah mezi vlastnostmi nádoru, prognózou pacienta a imunitním kontextem, který takto definovaný zahrnuje: počet, respektive denzitu funkčně definovaných populací imunitních buněk a jejich lokalizaci v centru či invazním okraji nádoru (viz obr. 8) (Angell *et al.*, 2020; Fridman *et al.*, 2012). V těchto regiorech se liší i biologie nádoru samotného, jak ilustruje například to, že epiteliálně-mezenchymální tranzice se odehrává právě zde (Galon *et al.*, 2014). Z těchto poznatků vychází Imunoskóre – metodika zaměřená na charakterizaci imunitního kontextu („immune contexture“) nádoru. (Galon *et al.*, 2014, 2013; Pagès *et al.*, 2018)



Obr. 8: Vztah mezi imunitním kontextem nádoru a imunitním skóre (vlevo) a ilustrace stanovení imunitního skóre (vpravo). Upraveno podle Galon *et al.* (2014).

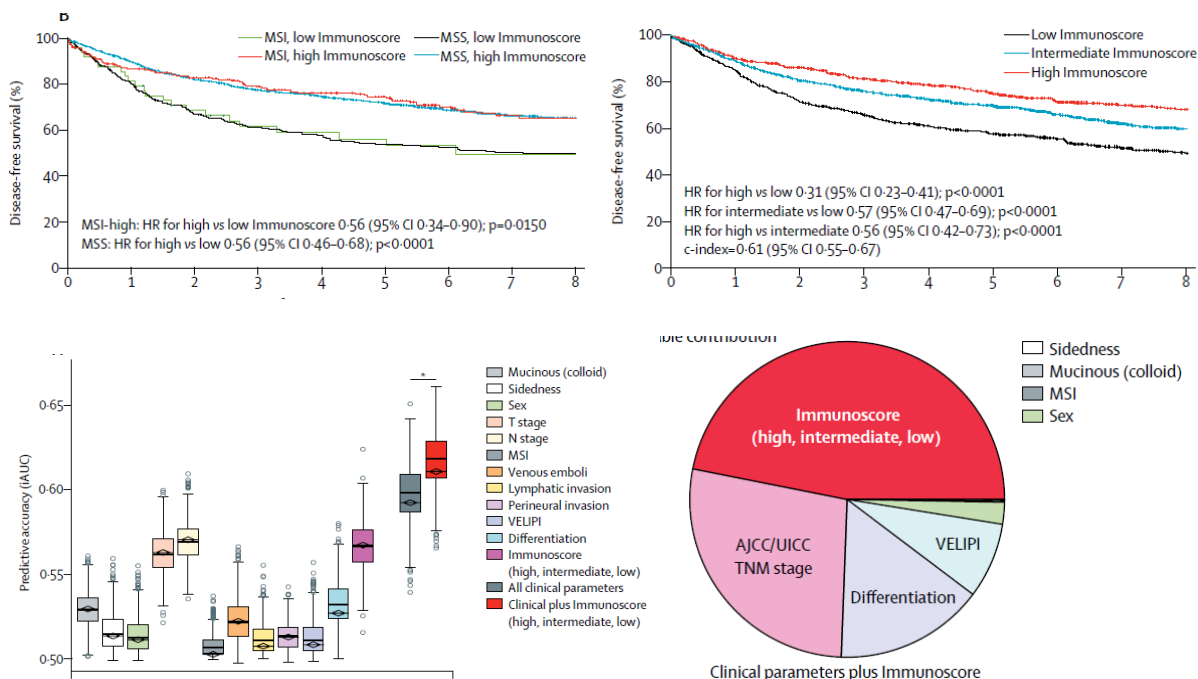
### 2.8.3 IMUNOSKÓRE V KLINICKÉ PRAXI

Pro dosud největší provedenou studii validující Imunoskóre (Pagès *et al.*, 2018) byla využita kvantifikace CD3+ a CD8+ T lymfocytů v invazním okraji, namísto funkčně přesněji definované populace paměťových CD45RO+ buněk, vzhledem ke ztrátě antigenicity a problémům s pozadím při značení CD45RO popř. GZMB na skladovaných řezech (Galon *et al.*, 2014). Rozsah tkáně mezi nádorovou a zdravou tkání definovaný jako invazní okraj se pak mezi studiemi liší, původně byl definován jako 1 mm (GALON *et al.*, 2013), v poslední publikované práci pak jako 720 mikrometrů (Angell *et al.*, 2020) a u zmíněné validační studie (Pagès *et al.*, 2018) není přesná definice uvedena.

Díky využití semi-automatizované analýzy bylo stanovení imunitního skóre reprodukcibilní mezi patologií a centry ( $r = 0,97$  pro CT i IM), zejména v porovnání s analýzou TIL na řezech barvených hematoxylinem a eosinem (shoda v 88 % případů u „Imunoskóre“ a 4 % u hematoxylinem a eosinem barvených řezů). Zároveň porovnání pacientů s MSI-pozitivními a MSI-negativními nádory potvrdilo, že vliv MSI na prognózu je zprostředkován přítomností či nepřítomností imunitní odpovědi (jak ilustrují Kaplan-Meierovy křivky přežití pacientů vzhledem k mikrosatelitární nestabilitě či Imunoskóre (viz obr. 9). Studie dále potvrdila prediktivní schopnost Imunoskóre při stratifikaci pacientů a zároveň i to, že v přesnosti predikce je



Imunoskóre srovnatelné nebo převyšuje všechny další parametry (kromě MSI-statutu) a jeho zahrnutí do analýzy signifikantně zlepší přesnost predikce celkového přežití pacientů (viz obr. 9).



Obr. 9: Nejdůležitější výsledky mezinárodní studie validující „Imunoskóre“ metodiku. Nahoře vlevo: Kaplan-Meierovy křivky přežití pacientů stratifikovaných na základě mikrosatelitární nestability či imunitního skóre. Nahoře vpravo: rozdílná prognóza pacientů na základě Imunoskóre. Dole: porovnání Imunoskóre s dalšími prognostickými parametry z hlediska prediktivní přesnosti (vlevo) a relativního příspěvku k prognóze (vpravo). Upraveno podle (Pagès et al., 2018)

## 2.8.4 IMUNOSKÓRE JAKO PREDIKTOR ODPOVĚDI NA TERAPII

Vzhledem k tomu, že úspěšnost terapie ICIs je ze svého principu závislá na předchozí přítomnosti imunitních buněk v nádoru (navzdory jejich vyčerpání), má Imunoskóre spolu s dalšími metodami mapujícími stav imunitní odpovědi potenciál zefektivnit predikci účinnosti těchto terapií a zefektivnit jejich indikaci (Angell et al., 2020).

U rakoviny prsu a metastatického CrCa je cytotoxická imunitní odpověď prediktorem lepší odpovědi na adjuvantní chemoterapii. Zůstává ale otázkou zda je přítomnost imunitních buněk spojená s lepší odpovědí na terapii, či jen sama o sobě zlepšuje prognózu pacienta (Fridman et al., 2012). U CrCa lze odpověď na terapii predikovat z analýzy mikrosatelitární nestability, vzhledem k výše popsanému vztahu k imunitní reakci (Le et al., 2015). Podobně jako v případě prognózy (Mlecnik et al., 2016a; Pagès et al., 2018) i v případě predikce na terapii lze předpokládat, že přímá analýza imunitního infiltrátu by zpřesnila analýzu mikrosatelitární nestability nebo by ji mohla nahradit. Zmíněná příčinná souvislost mezi absencí imunitní reakce a následným rozvojem metastáz ukazuje na potenciální benefit z terapií zaměřených na T buněčnou odpověď (anti-PDL1,



anti-PD1 a anti-CTLA4) zejména u pacientů v brzkém stádiu CrCa, kteří často mají cytotoxickou odpověď na nádor, jejíž zesílení může zabránit rozvoji a vzniku metastáz. (Angell *et al.*, 2020; Mlecnik *et al.*, 2016b, 2016a).

Potenciál využití Imunoskóre jakožto prediktivní pro terapie ICIs reflektuje i vývoj modifikací původní metodiky, které jsou založené na analýze CD8+ a PD-1L+ u nemalobuněčného karcinomu plic (Immunoscore® IC in Lung Cancer, 2020), analýze CD8+, CD3+ spolu se znaky T buněčného vyčerpání (Collignon *et al.*, 2019) či analýze CD8+, PD-1 a PD-1L u rakoviny prostaty (Chen *et al.*, 2020).

## 2.8.5 LIMITACE A BUDOUCNOST IMUNOSKÓRE

Limitujícím faktorem Imunoskóre metody je nízký počet použitých znaků: pouze CD3 a CD8 (Pagès *et al.*, 2018). V původní práci přitom autoři zmiňují důležitost paměťových CD45RO+ buněk (Galon *et al.*, 2006; Pagès *et al.*, 2009). Dále také na základě systémové analýzy imunitního mikroprostředí pak upozorňují na vysoký počet a zároveň podstatnou roli Tfh buněk, B buněk a CD45RO paměťových buněk v limitaci rozvoje CrCa (Bindea *et al.*, 2013). Navíc počet a lokalizace CD3+ a CD8+ buněk, respektive jejich nepřítomnost v nádoru, mohou být ovlivněny nedostatečnou aktivací až inhibicí T buněk, absencí chemokinů atrahujících T buňky či mechanickou bariérou zabraňující migraci buněk (Blank *et al.*, 2016). Imunoskóre v dnešní podobě neposkytuje informaci o důvodu pro absenci imunitní odpovědi a má tak omezenou vypovídající hodnotu vzhledem k výběru vhodné biologické terapie. Navíc samotná přítomnost cytotoxických buněk rozpoznávajících neoantigeny nemusí znamenat účinnou imunitní odpověď, protože té může bránit přítomnost imunosupresivních buněk či separace cytotoxických a nádorových buněk (Angelova *et al.*, 2018).

Další limitace Imunoskóre i většiny metod histopatologické klasifikace je analýza omezeného množství nádorové tkáně. Často jde o jediný řez či o malou oblast získanou biopsií. Reprezentativnost takové analýzy velmi závisí na homogenitě analyzovaného znaku. Za příklad může sloužit práce Van den Eynde *et al.* (2018) poukazující na horší reprezentativnost vybrané oblasti (biopsie) vzhledem k situaci v nádoru (zde metastáz) v případě PD-L1, znaku kritického pro indikaci imunoterapií. Tento rozdíl je dán právě větší heterogenitou v PD-L1 značení. Obdobná je situace v případě FOXP3 v metastázách. Narozdíl od ostatních analyzovaných znaků, není rozdíl mezi infiltrací v jednotlivých regionech podchycen v případě analýzy vybraných oblastí, ale jen při analýze celého řezu. (Mlecnik *et al.*, 2018)

Na komplexní analýzu imunitního nádorového mikroprostředí pro účely výzkumu (nikoliv pro diagnostiku) se zaměřují projekty derivované z původního Imunoskóre či z jeho vývoje: Imunoskóre CR (TMExplore™: HalioDx, 2020) pro klinický výzkum mapuje jednak přítomnost

cytotoxických T buněk, ale i znaků vyčerpání T buněk či znaků imunosuprese. Kombinaci všech těchto metod pak představuje Immunogram (Data analysis & interpretation: HalioDx., 2020) poskytující informaci o infiltraci T buňkami a cytotoxickými T buňkami, expresi supresorových molekul, genů spojených s imunitní odpovědí, diversitě T receptorů, MSI statutu nádoru a klíčových („driver“) mutacích.

Kromě samotné diagnostiky nelze pominout ani vzrůstající potřebu zavedení odpovídajících metodik a parametrů pro hodnocení nových terapeutik založených na imunomodulaci v preklinických a klinických studiích. Vzhledem k tomu, že cílem ani mechanismem těchto terapií není okamžité zastavení progresu nádoru, ale vyvolání imunitní odpovědi, je jejich efekt detekovatelný v dlouhodobějším horizontu a v počátku terapie může být i zdánlivě negativní (pokračující růst nádoru). Kromě parametrů, které se běžně v klinických studiích používají (celková doba přežití, doba bez progresu onemocnění), by pro hodnocení nových terapeutik bylo vhodné zařadit i přímé měření imunitní odpovědi na nádor vzhledem k tomu, že je to parametr odpovídající mechanismu účinku těchto terapeutik. Navíc detekce imunitní odpovědi poskytuje informaci dříve než výše zmíněné parametry (vytvoření imunitní odpovědi předchází regresi nádoru) (Angell *et al.*, 2020).

## 2.9 3D HISTOLOGIE

### 2.9.1 PROJASŇOVACÍ METODY

Snímání objemných vzorků je zpravidla omezeno jen na několik svrchních desítek (či stovek u dvoufotonové mikroskopie) mikrometrů v důsledku jejich neprůhlednosti způsobené rozptylem či absorpcí světla v tkáni (Costantini *et al.*, 2019; Ke *et al.*, 2013; Muntifering *et al.*, 2018). Pro 3D rekonstrukci objemných vzorků je nutné tkáň buďto rozdělit na tenké řezy, nebo ji dostatečně zprůhlednit pomocí projasňovacích metod, aby bylo možné snímání v celku.

V případě použití klasické histologie – tedy řezání tkáně na mikronové řezy, jejich postupné skenování a *in silico* rekonstrukce 3D – jde o časově náročný a pracný proces. V důsledku toho se většina studií využívajících fyzické řezání tkáně omezuje jen na řádově desítky řezů. Výsledkem je buď ztráta rozlišení v jedné ose nebo rekonstrukce jen velmi omezeného objemu. (Jansen *et al.*, 2019; Roberts *et al.*, 2012) Běžnou součástí rekonstrukce 3D obrazu z 2D řezů je i registrace (přiřazení) získaných řezů k referenčnímu „atlasu“ v rámci rekonstrukce a následné anotace nasnímané tkáně (Meijering *et al.*, 2016). To je problematické v případě nádorů, které jsou každý jeden morfologicky unikátní. Další komplikací při rekonstrukci 3D objemu z 2D řezů je vznik artefaktů během řezání tkáně, umístování na sklíčko a její fixace. Důsledkem je registrace nedostatečná pro lokalizaci jednotlivých buněk (Jansen *et al.*, 2019) či posun mezi jednotlivými řezy v řádech desítek mikrometrů (Roberts *et al.*, 2012). Vzhledem ke zmíněným nedostatkům

klasické histologie se stále více uplatňuje projasňování nádorových tkání a jejich snímání vcelku (Chen *et al.*, 2019; Kubota *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2019; Nojima *et al.*, 2017; Samson *et al.*, 2020; Tanaka *et al.*, 2017).

Ke zprůhlednění či projasnění (z angl. „clearing“) tkáně přispívají tři mechanismy. Odstranění lipidů a sjednocení indexu lomu (RI z anglického „refractive index“) tkáně a okolního média má za cíl zabránit rozptylu světla ve vzorku (Costantini *et al.*, 2019). Případné odstranění pigmentů má pak za cíl snížit absorpci světla ve tkáni (Susaki *et al.*, 2015). Kim *et al.* (2018) ukázali na spektru různých tkání, že důležitější, než delipidace je pro finální transparentci sjednocení indexu lomu. Po delipidaci a případné depigmentaci tvoří projasněnou tkáň zejména proteiny, z nichž většinu představují složky ECM. Právě množství a orientace ECM má významný vliv na kvalitu projasnění a také na vhodný RI projasňovacího média. (Kim *et al.*, 2018) V případě projasňování nádorů se to projevuje horším projasněním fibrózních regionů tkáně (Chen *et al.*, 2019) ve kterých dochází k většímu rozptylu světla (Jacques, 2013).

Z hlediska způsobu, jakým je projasnění dosaženo lze dělit projasňovací techniky na tři skupiny podle typu chemikálií a principu kterým dosahují sjednocení RI. Prvním a nejstarším způsobem je delipidace a prosycení tkáně pomocí organických rozpouštědel. Mezi tyto metody patří zejména 3DISCO (Ertürk *et al.*, 2012), iDISCO (Renier *et al.*, 2014) a na analýzu nádorové tkáně zaměřená DIPCO metoda (Tanaka *et al.*, 2017). Jejich výhodou je zejména rychlost a malé náklady, hlavním nedostatkem je použití toxických reagentů potenciálně korozivních pro optiku mikroskopů (Lloyd-Lewis *et al.*, 2016).

Druhým způsobem je přeměna tkáně na hydrogelovou síť, ve které jsou proteiny a nukleové kyseliny fixovány na akrylamidovou matrix, která je následně delipidována detergentem. Delipidace může být urychlena použitím elektroforetického aparátu (Du *et al.*, 2018), či pasivní založená na prosté difuzi (Yang *et al.*, 2014). Tyto metody vycházející z CLARITY jsou rychlé a poskytují dobré projasnění a zachování struktury tkáně. Nevýhodou je potřeba speciálního vybavení v podobě elektroforetického aparátu, případně delší časy při delipidaci prostou difuzí. (Ariel, 2017).

Posledním způsobem je prostá inkubace vzorků ve vodných roztocích detergentů, cukrů, močoviny, aminoalkoholů či dalších hydrofilních molekul. Ty zajišťují delipidaci tkáně, v případě močoviny částečnou hyperhydrataci proteinů (snižuje jejich RI), koncentrované roztoky cukrů pak vhodný RI (Richardson and Lichtman, 2015; Hama, H., 2015). CUBIC, jedna z těchto metod, navíc využívá schopnosti aminoalkoholů odstraňovat z tkání krevní barviva absorbující světlo a tím dále zlepšuje průhlednost tkáně (Susaki *et al.*, 2015).

Popis všech publikovaných protokolů a detailní vysvětlení fyzikálně chemických principů přesahuje rámec této práce a lze je najít v mnoha přehledových článcích (Ariel, 2017; Costantini *et al.*, 2019; Richardson and Lichtman, 2017, 2015). Vzhledem k zaměření práce je však třeba zmínit, že všechny popsání přístupy k projasňování byly opakovaně použity pro zprůhlednění a analýzu nádorových i patientských tkání (Chen *et al.*, 2019; Glaser *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2019; Lloyd-Lewis *et al.*, 2016; Nojima *et al.*, 2017; Tanaka *et al.*, 2017).

#### 2.9.1.1 ZNAČENÍ PROJASNĚNÝCH TKÁNÍ

Značení projasněných tkání malými fluorescenčními molekulami a protilátkami je nezbytné, zejména s ohledem na rozšíření těchto metod do oblasti výzkumu lidských patologií (na zvířecích modelech jsou alternativou transgenní organismy s expresí fluorescenčních proteinů). Značení malými molekulami většinou nepředstavuje větší problém, díky jejich dobré penetraci do tkáně (Tyson *et al.*, 2019). Komplikací při jejich využití je v některých případech absence či rozporuplná informace o kompatibilitě s danou metodikou. Například u PACT a CUBIC metody lze najít informaci jak o jejich kompatibilitě (Neckel *et al.*, 2016; Nehrhoff *et al.*, 2016), tak o nekompatibilitě s DAPI (J. Xu *et al.*, 2019). Dalším aspektem, který je třeba vzít v potaz jsou vlastnosti závislé na vlnové délce použitých fluorescenčních barviv. Značky v modrém spektru, typicky DAPI či Hoechst, jsou více náchylné ke ztrátě signálu v případě nedostatečného projasnění tkáně (Marx, 2016). PI či DRAQ5 v červeném či vzdáleném červeném spektru absorbují ve viditelných oblastech spektra a mohou snižovat průhlednost tkáně a tím snižovat efekt projasnění (Miller *et al.*, 2005).

Náročnější je značení protilátkami které pro svou velikost hůře penetrují do tkáně ačkoliv delipidace tkáně částečně zlepšuje jejich penetraci (Susaki *et al.*, 2014). Míra projasnění i penetrace protilátek je závislá na struktuře tkáně. V denzních tkáních bohatých na ECM může její přítomnost bránit probarvení tkáně protilátkami, které se v ní zachycují namísto difuze do vzorku (Lee and Sun, 2016). Alespoň v případě na hydrogelu založených metod není problémem kompatibilita s AlexaFluor fluorofory (vlnové délky 488, 555, 568 a 647), respektive jejich zhášení. Vzhledem k funkčnosti všech zmíněných sekundárních protilátek je případná absence signálu daná nekompatibilitou primární protilátky s projasňováním (Tyson *et al.*, 2019).

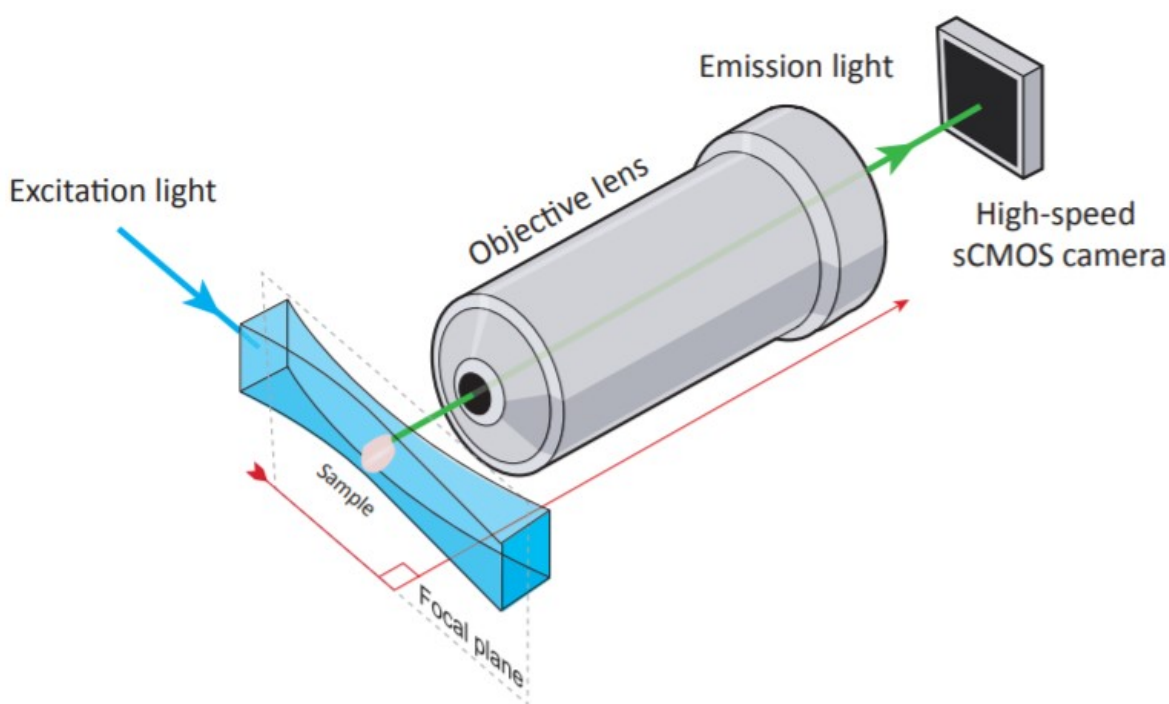
Kromě fixace, která může poškozovat některé epitopy, i samotný proces projasňování ve svém principu narušuje strukturu tkáně a může vést ke ztrátě značné části proteinů a tím i epitopů (Muntifering *et al.*, 2018). Na druhou stranu většina projasňovacích metod demonstruje použití s protilátkami (Ueda *et al.*, 2020). V případě CLARITY je navíc strukturou hydrogelu možné optimalizovat penetraci protilátek (Yang *et al.*, 2014) a s využitím elektroforetického aparátu ji výrazně urychlit (Kim *et al.*, 2015). Metoda iDISCO byla vyvinuta záměrně s cílem zkombinovat projasňování organickými rozpouštědly a značení protilátek. Výhodou metod založených na inkubaci ve vodných roztocích je pak právě dobré zachování struktury (makro- i mikroskopické)

a s tím spojená kompatibilita se značením protilátkami. Navíc byla pro CUBIC projasněné vzorky, stejně jako předtím pro CLARITY (Du *et al.*, 2018; Murray *et al.*, 2015), demonstrována možnost opakovaného značení protilátkami, což rozšiřuje potenciální množství analyzovaných znaků v rámci jednoho vzorku (Xu *et al.*, 2019).

Vzhledem ke stěžejní roli značení protilátkami ve fluorescenční mikroskopii se objevují stále nové práce demonstrující způsoby, jak zlepšit značení projasněných tkání. Ať už jde o titrace protilátek na menších objemech tkáně (Chen *et al.*, 2019), o využití hydrostatického tlaku či centrifugace ke zlepšení penetrace do tkání bohatých na ECM (Lee *et al.*, 2016) či využití elektroforetického aparátu pro urychlení difuze protilátek do vzorku (Li *et al.*, 2015, p.). Další možností je využití menších fragmentů protilátek, takzvaných nanobodies. (Marx, 2016).

## 2.9.2 LIGHTSHEET MIKROSKOPIE

Lightsheet mikroskopie (také označovaná SPIM z anglického „single plane illumination microscopy“) je metodou fluorescenční mikroskopie umožňující optické řezání (z anglického „optical sectioning“). Při optickém řezání je snímán pouze signál z roviny ostrosti, v kontrastu s klasickou fluorescenční mikroskopií, kde je zaznamenán signál z celého objemu vzorku. Fluorescenční signál z částí vzorku mimo rovinu ostrosti znemožňuje zobrazování silných vzorků (i pokud jsou projasněné) s dostatečným rozlišením pomocí klasické fluorescenční mikroskopie. Díky tomu, že metody optického řezání snímají pouze signál z roviny ostrosti, umožňují zobrazování silných vzorků s minimální ztrátou rozlišení (pokud jsou dostatečně průhledné, viz předchozí kapitola) (Dobosz *et al.*, 2014).



*Obr. 10: Princip lightsheet mikroskopie, kdy je iluminována pouze rovina ostrosti a nedochází k excitaci a vysvícení fluoroforů mimo ni. Zároveň je snímáno celé zorné pole najednou a snímání je rychlejší než u skenovacích metod. Upraveno podle Uhlén and Tanaka (2018).*

Kromě lightsheet mikroskopie umožňují optické řezání i další metody jako konfokální, dvoufotonová a spinning disk mikroskopie (vyčerpávající výčet všech metod používaných pro zobrazování projasněných vzorků přesahuje rozsah této práce, lze je však najít v (Costantini *et al.*, 2019), kde je shrnuto více než 800 dosud publikovaných prací zabývajících se projasňováním včetně metod zobrazení). Nevýhodou konfokální a spinning disk mikroskopie je zejména vysoká fototoxicita a s tím spojené riziko vysvícení vzorku. K excitaci fluorescence totiž dochází i mimo snímanou rovinu a tento signál je posléze odstraněn konfokální clonou. U dvoufotonové mikroskopie k tomuto nedochází, zde je však omezením zejména nízká rychlost snímání vzhledem k tomu, že zobrazená rovina je skenovaná bod po bodu. U lightsheet mikroskopie dochází pouze k iluminaci snímané části vzorku (to snižuje celkovou fototoxicitu), zároveň je však snímána celá rovina najednou a tím je akvizice násobně rychlejší (viz obr. 10).

Rychlost snímání, malá fototoxicita, variabilita uchycení vzorku a relativně snadná konstrukce dělá z lightsheet mikroskopie metodu, která má potenciál rozšířit 3D histologii v primárním výzkumu a přiblížit jí klinice (Glaser *et al.*, 2019; Poola *et al.*, 2019). Nejbližší využití v klinice je pravděpodobně lightsheet mikroskop open-top konstrukce. Ten může sloužit pro rychlé peroperativní zobrazení resekovaných tkání, pro screening vzorků k dalšímu patologickému zpracování či pro 3D rekonstrukci celých projasněných biopsií. (Glaser *et al.*, 2017). V kombinaci s arteficiálním barvením hematoxylinem a eosinem *in silico* je pak výsledkem histologický snímek celé biopsie (namísto několika řezů), vizuálně odpovídající expertíze patologa, ale s přidanou hodnotou v podobě informace o 3D kontextu (Reder *et al.*, 2019). V primárním výzkumu nádorů je přínosem lightsheet mikroskopie možnost snímat celé orgány či modelové organismy a mapovat tak migraci buněk či tvorbu metastáz (Li *et al.*, 2018; Pan *et al.*, 2016). Schopnost snímat celé orgány pro účely detekce metastáz má pak i klinický přesah vzhledem k tomu, že jejich detekce v lymfatických uzlinách je běžnou součástí histopatologie a snímání celých lymfatických uzlin na místo řezů detekci zpřesňuje (Nojima *et al.*, 2017).

### 2.9.3 ANALÝZA DAT

Nedílnou součástí jak 2D tak 3D histologie je analýza obrazových dat, která umožňuje kvantitativní, reprodukcibilní a objektivní zhodnocení histologické informace. Metoda Imunoskóre od začátku svého vývoje stojí právě i na automatizované kvantifikaci TIL s využitím analýzy obrazu, která přispívá k její reprodukcibilitě a plikovatelnosti v klinice (Galon *et al.*, 2006; Pagès *et al.*, 2018).

K analýze obrazových dat je využívána široká paleta komerčně dostupného software (SW) pro analýzu histologických řezů (taková řešení nabízí TissueGnostics, Definiens či PerkinElmer) či pro analýzu 3D dat (například Imaris, Amira či Arivis). Nekomerční (open-source) alternativu pro analýzu obrazových dat (jak řezů, tak 3D dat) představuje zejména SW ImageJ (a jeho rozšířená verze FIJI) či MATLAB. Výhodou nekomerčního SW je otevřenost a reproducibilita vytvořených analytických postupů. Ta je vykoupena menší uživatelskou přívětivostí, vzhledem k nutnosti vlastního programování a omezeného grafického rozhraní.(Heindl *et al.*, 2015) Uživatelsky přívětivější alternativou ke standardnímu programování s využitím klasického textového editoru je přístup takzvaného grafického programování, které pro potřeby analýzy obrazu umožňuje SW KNIME. Zde místo sekvence příkazů uživatel zařazuje jednotlivé funkce za sebe v podobě grafického diagramu.

Komerční i nekomerční SW případně jejich kombinace byly využity k analýze tumor infiltrujících lymfocytů či jiných aspektů nádorového mikroprostředí v projasněné tkáni. Rekonstrukce obrazu a segmentace pomocí pluginu WEKA v ImageJ (Arganda-Carreras *et al.*, 2017) v kombinaci s vizualizací v Imaris byla využita pro analýzu CD45+ buněk v projasněném nádoru mléčné žlázy (Lee *et al.*, 2017). Obdobný přístup byl využit i k segmentaci a analýze cév, CD8+ a CD3+ buněk v projasněném nádoru mléčné žlázy a nádoru hlavy a krku člověka (Lee *et al.*, 2019). Analýza s využitím ImageJ byla, kromě identifikace a kvantifikace TIL, využita i ke screeningu metastáz v projasněných patientských uzlinách (v kombinaci s Imaris) (Nojima *et al.*, 2017) či k detekci EMT a cév v různých lidských nádorech pomocí (v kombinaci s Amira, a MATLAB) (Tanaka *et al.*, 2017).

Novým velmi rychle se rozvíjejícím přístupem k analýze dat je využití strojového učení s učitelem (z anglického „supervised machine learning“). Tedy takové, kde je pomocí počáteční anotace na malém datasetu odborníkem (v případě analýzy histologických řezů zpravidla patologem) vytrénován algoritmus, který je pak schopen provádět obdobnou analýzu efektivně a rychleji a umožňuje tak vyhodnocení velkého množství dat (Yuan, 2016). Takový přístup umožňuje například zmíněný WEKA plugin v programu ImageJ (Arganda-Carreras *et al.*, 2017), či Segment.ai modul v SW NIS-Elements (kde je navíc možnost využití neuronových sítí i ke zlepšení kvality obrazu či odstranění šumu).

### 3 CÍLE

Cílem diplomové práce je vývoj metody pro kvantifikaci a lokalizaci TIL ve 3D s využitím dvou nových metodických přístupů. Kombinace projasňování tkání (z angl. „tissue clearing“) a lightsheet mikroskopie umožní barvení, snímání a analýzu až do hloubky 1 mm tkáně vcelku v čase nepřesahujícím dva týdny. Využit bude indukovaný myší model CrCa z buněčné linie CT26 v BALB/c syngenním kmenu myší.

Dílčí cíle jsou:

- výběr vhodné metody pro zprůhlednění tkáně až do hloubky 1 mm na základě porovnání tří projasňovacích protokolů lišících se chemickým přístupem, kterým je dosaženo projasnění
- optimalizace značení projasněných vzorků malými molekulami a primárními protilátkami konjugovanými s fluorofory
- využití méně časově a finančně náročné metody strukturované iluminace pro zobrazování objemných projasněných vzorků jako alternativy k lightsheet mikroskopii
- demonstrace kvantifikace CD3<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> lymfocytů ve 3D umožňující srovnání s kvantifikací na 2D řezech



## 4 MATERIÁL A METODIKA

### 4.1 MATERIÁL

#### 4.1.1 MODELOVÉ ORGANISMY

Zdrojem tkání byly myši inbredních kmenů C57BL/6 či MHCII/EGFP, knock-in myši pocházející z embryonálních kmenových buněk kmene 129/Sv, H-2<sup>b</sup> (Boes *et al.*, 2002) získané darem od Prof. RNDr. Jana Černého, PhD. z Laboratoře buněčné imunologie (Přírodovědecká fakulta UK, Praha), chované za standardních podmínek (55% vlhkost, teplota 22 °C, krmná směs ST1 a voda *at libitum*). Zdrojem myší nádorové tkáně byly myši kmene BALB/c s nádory indukovanými subkutánní injekcí syngenní CT26 linie odvozené od metastatického kolorektálního karcinomu, získané darem od RNDr. Marka Kováře, PhD z Laboratoře nádorové imunologie (Mikrobiologický ústav AV ČR, Praha).

#### 4.1.2 PROTILÁTKY

Antigen	Klon	Fluorofor	Výrobce	Katalogové číslo	Konc. (µg/ml)	Finální ředění
<b>CD4</b>	GK1.5	Purifikovaná protilátka	Exbio	10-580-C100	1000	1:250
<b>TCRβ</b>	H57-597	Purifikovaná protilátka	Exbio	11-571-C100	300 či 5500	NA či 1:1000
<b>CD24</b>	YBM 5.10.4	Purifikovaná protilátka	UMG	NA	5260	NA
<b>Thy 1.2</b>	YTS 154.7.7.10	Purifikovaná protilátka	UMG	NA	4700	NA
<b>Gr-1</b>	RB6-8C5	Purifikovaná protilátka	UMG		4700	NA
<b>Myší IgG (H+L)</b>	Polyklonální	Alexa Fluor® 488	Jackson ImmunoResearch	115-545-003	1500	1:800
<b>Myší IgG (H+L)</b>	Polyklonální	Alexa Fluor® 647	Jackson ImmunoResearch	NA	1500	1:800
<b>CD4 epitop A</b>	YTS 177.9.6.1	Purifikovaná protilátka	UMG	NA	2400	NA

<b>Kryší IgG (H+L)</b>	Polyklonální	Alexa Fluor® 488	Life technologies	A11006	2000	1:500
<b>Kryší IgG (H+L)</b>	Polyklonální	Alexa Fluor® 647	Invitrogen	A21247	2000	1:500
<b>Křeččí IgG (H+L)</b>	Polyklonální	Alexa Fluor® 647	Life technologies	A21451	2000	1:500

#### 4.1.3 FLUOROFORY A FLUORESCENČNÍ BARVIVA PRO KONJUGACI PROTILÁTEK

<b>Fluorofor</b>	<b>Reaktivní skupina</b>	<b>Excitace/emise</b>	<b>Výrobce</b>	<b>Katalogové číslo</b>
<b>Alexa 488</b>	<b>Fluor™</b> 5-SDP ester	495/524	ThermoFischer	A30052
<b>Janelia 646</b>	<b>Fluor</b> NHS (succinimidyl) ester	646/664	TOCRIS biotechnie brand	a 6148
<b>5(6)-SFX (Fluorescein)</b>	NHS (succinimidyl) ester	494/518	TOCRIS biotechnie brand	a 6488
<b>DAPI</b>		358/461	ThermoFischer	D1306
<b>PI</b>		535/617	Invitrogen™	P21493
<b>DRAQ5</b>		647/681	ThermoFischer	62251
<b>Hoechst 33342</b>		350/481	Invitrogen™	H3570

#### 4.1.4 CHEMIKÁLIE A PUFY

<b>Reagencie</b>	<b>Distributor</b>	<b>Katalogové číslo</b>
<b>Dimetylsulfoxid</b>	Sigma-Aldrich	276855-1L
<b>Dimetylsulfoxid s reriiní filtovaný</b>	Sigma-Aldrich	D2660-100ML
<b>Uhličitán sodný</b>	Lachema	47035039
<b>Hydroxylamin</b>		
<b>Glycin</b>	Penta	G05103

<b>RPMI médium</b>	Sigma-Aldrich	R8758-500ML
<b>Azid sodný</b>	P-Lab	R.K305.3
<b>Želatina</b>	Sigma-Aldrich	G7765-250ML
<b>Hydrogenuhlíčan sodný</b>	Lachema	F-730-28
<b>Paraformaldehyd</b>	Sigma-Aldrich	16005-1KG-R
<b>TRITON® X 100</b>	Sigma-Aldrich	X100-500ML
<b>Trietanolamine</b>	PENTA	27590-11000
<b>DBE</b>	Sigma-aldrich	33630-1L
<b>Sorbitol</b>	PENTA	26260-31000
<b>SHOC kit (sada na projasňování tkání)</b>	Binaree	SHOC-001
<b>Etanol</b>	Penta	603-002-00-5
<b>Sacharóza</b>	PENTA	24970-31000
<b>Močovina</b>	PENTA	21420-31000
<b>THF</b>	Sigma-Aldrich	401757-2L
<b>DCM</b>	SigmaAldrich	33630-1L
<b>Quadrol (N,N,N',N'-Tetrakis(2-Hydroxypropyl)ethylenediamine)</b>	Sigma Aldrich	122262-1L
<b>10x PBS</b>	UMG	
<b>10x HBSS</b>	UMG	
<b>RPMI-1640 médium</b>	Sigma	R8758
<b>Agaróza s nízkou teplotou tuhnutí (LMA)</b>	ThermoFischer	R0801
<b>Hydroxid sodný</b>	Penta	H 16111
<b>Azid sodný</b>	Penta	R.K305.3
<b>Tissue-Tek® O.C.T. Compound</b>	SAKURA FINETEK USA INC	4583
<b>Zmrazovací médium</b>	Bamed	HI-00890

#### 4.1.5 SPOTŘEBNÍ MATERIÁL

<b>Materiál</b>	<b>Výrobce</b>	<b>Katalogové číslo</b>
<b>1,5ml centrifugační zkumavka</b>	FisherScientific	2103.3502
<b>Neprůhledná centrifugační zkumavka</b>	Axygen	ST-050-SS-X
<b>Uzávěr neprůhledné centrifugační zkumavky</b>	Axygen	SCO-LP-BR
<b>Sítka pro homogenizaci tkání</b>	Corning	431750
<b>Zmrazovací zkumavka</b>	Biologix	81-7204
<b>96 jamková destička</b>	Fisherbrand	11907954
<b>24 jamková destička</b>	Costar	3524
<b>12 jamková destička</b>	Costar	3512
<b>6 jamková destička</b>	Costar	3506
<b>Molekulární síta</b>	SigmaAldrich	20305
<b>Kapiláry SIMAX</b>	Kavalierglass	1632261083526
<b>Temflex 1500 izolační páska</b>	3M	
<b>Skla podložní Superfrost plus™</b>	ThermoFischer	J7800AMNT
<b>Žiletka do mikrotomu</b>	Leica	14035838382
<b>50ml centrifugační zkumavka</b>	Fisherscientific	05-539-8
<b>Molekulární síta</b>	SigmaAldrich	20305
<b>Pasteurova pipeta</b>	Fischerbrand	2101.6412/13439108
<b>Paraformaldehyd</b>	SigmaAldrich	16005-1KG-R
<b>Petriho misky</b>	Brand	9994.4365/10161821
<b>Kryo zkumavky samostojící 2 ml</b>	Brand	10791571
<b>Zkumavky (5 ml)</b>	Corning	14-959AA
<b>Test na přítomnost peroxidů</b>	Fischer Scientific	7305.1312
<b>Močovina, p.a., 1 kg</b>	Penta	60645-1000

<b>Sacharóza, p.a., 1 kg</b>	Penta	60774-1000
<b>Skla krycí 18x18 mm</b>	ThermoFisher	1820.1218
<b>Skla krycí 24 x 60 mm</b>	ThermoFisher	1820.126
<b>Skla podložní 26x76mm</b>	ThermoFisher	1820.1100
<b>Ubrousky na čištění mikroskopických objektivů</b>	Fisherbrand	11730656
<b>Lahev s GL45 500ml</b>	ThermoFisher	1527.05
<b>Mikrozkumavky Eppendorf 1,5 ml</b>	ThermoFisher	2103.3550
<b>1.5 ml tube PP</b>	FisherScientific	2103.3502
<b>Stříkačkové filtry, pr. 25 mm, 0,2 um</b>	ThermoScientific	9994.6520
<b>Páska popisovací samolepicí bílá 19 mm</b>	BEL-ART	A630075
<b>Páska popisovací samolepicí bílá 12,5 mm</b>	BEL-ART	A630005
<b>Popisovač lab marker - thick - black</b>	P-lab	R308352.1
<b>Rukavice</b>	P-Lab	L935003.2
<b>Špičky (5 ml)</b>	Gilson	F161571
<b>Špičky (1.2 ml)</b>	Gilson	F161110
<b>Špičky (0.3 ml)</b>	Gilson	F161730
<b>Špičky (0.2 ml)</b>	Gilson	F161930
<b>Špičky (0.02 ml)</b>	Gilson	F161450
<b>Fluorescenční kuličky</b>	Becton Dickinson	650622
<b>Žiletky do vibratomu</b>	Astra	
<b>12-ti kanálové pipetovací vaničky</b>	Biologix	25-1202

#### 4.1.6 LABORATORNÍ VYBAVENÍ

<b>Vybavení</b>	<b>Výrobce</b>
<b>ThermoMixer</b>	Eppendorf
<b>Odsávačka</b>	Eppendorf
<b>Axizoom s ApoTome</b>	ZEISS

<b>Leica Dmi8</b>	Leica
<b>Zeiss Z.1</b>	ZEISS
<b>BD FACsverse</b>	Becton Dickinson
<b>Digestoř</b>	
<b>Refraktometr</b>	ZEISS
<b>Multikanálová pipeta</b>	Gilson
<b>Pitevní souprava</b>	
<b>Vortex</b>	Scientific industries

#### 4.1.7 SOFTWARE

<b>Software</b>	<b>Výrobce</b>	<b>Verze</b>
<b>ZEN (black edition)</b>	ZEISS	2.9.8
<b>ZEN (blue edition)</b>	ZEISS	2.3
<b>ImageJ (Fiji)</b>		2.0
<b>FlowJo</b>	Becton Dickinson	10.6.1
<b>Leica Application Suite X</b>	Leica	3.6.2
<b>BD FACSuite</b>	Becton Dickinson	1.3
<b>Huygens Professional</b>	Scientific Volume Imaging	19.1
<b>Imaris</b>	Oxford Instruments	9.6

## 4.2 METODY

### 4.2.1 ZPRACOVÁNÍ TKÁNÍ PRO MIKROSKOPII

Všechny použité projasňovací metody vyžadují před samotným značením a projasňováním tkání fixaci formaldehydem (Tissue Clearing Kit; Ertürk *et al.*, 2012; Susaki *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2014). Myši byly usmrceny kraniální dislokací, a připevněny k pitevní podložce. Myším byly odebrány sleziny, mezenterické a inguinální lymfatické uzliny a mozky. V případě myší s nádory vyvolanými injekcí CT26 buněčné linie do pravého boku myši, byla před vyjmutím ostatních orgánů nejdříve vypreparována nádorová tkáň. Ihned po vyjmutí byly tkáně opláchnuty v 4°C PBS a přemístěny do fixačního roztoku 3,7% formaldehydu, 4°C. Lymfatické uzliny byly fixovány 8 hodin v 2,5 ml roztoku, mozek, sleziny a nádorová tkáň byly fixovány 18 hodin v 10 ml roztoku. Poté byly tkáně promyty PBS v RT a odstraněny případné zbytky pojivových tkání a tukové tkáně pod mikroskopem Axiozoom V.16 (Zeiss) v PBS. Tkáně byly přemístěny do 30% sacharózy a inkubovány buď 24 hodin v 10 ml (mozek, slezina, nádorová tkáň) či 12 hodin v 2,5 ml (lymfatické

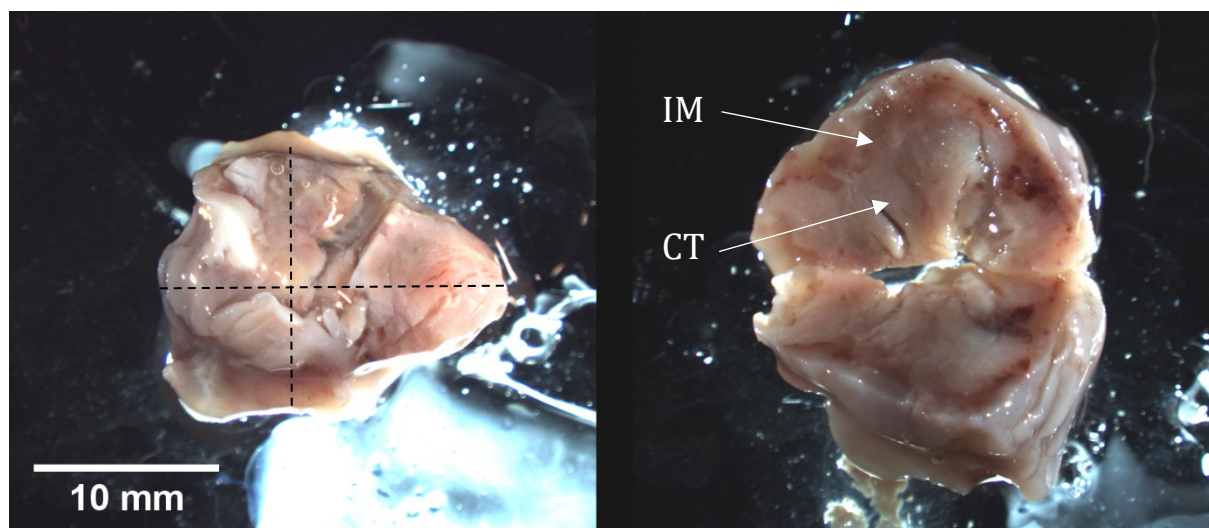
uzliny), 4°C. Poté byly tkáně přemístěny do zmrazovacího média na suchém ledu a skladovány v -80°C pro další použití. (Susaki *et al.*, 2015)

#### 4.2.2 PŘÍPRAVA 3,7% ROZTOKU FORMALDEHYDU

3,7% roztok formaldehydu byl připraven rozpuštěním 37g paraformaldehydu v 950 ml dH<sub>2</sub>O ve skleněné baňce. Za stálého míchání při teplotě 60 stupňů bylo zvyšováno přidáváním 1M NaOH pH až nad 11. Po rozpuštění veškerého paraformaldehydu a projasnění byl roztok schlazen na pokojovou teplotu a přidáváním 1M HCl sníženo pH na 7,4 – 7,6. Po doplnění objemu byl roztok alikvotován do 50 ml centrifugačních zkumavek přes 0,2μl filtr. Před uzavřením zkumavky byl roztok probublán dusíkem, zkumavka uzavřena a utěsněna omotáním parafilmu. Takto připravený roztok byl skladován v -20°C. Pro experimenty byl vždy využit čerstvě rozmražený roztok formaldehydu.

#### 4.2.3 URČENÍ OBJEMU NÁDORU

Po vyjmutí nádoru byl nádor nasnímán na mikroskopu Zeiss Axiozoom s objektivem PlanApo Z 0.5x a to v celku, a poté rozdělen na poloviny, tak aby bylo možné vizuálně lokalizovat invazní okraj a centrum nádoru (viz obr. 11). Objem nádoru byl odhadnut na základě vzorce  $V = 0,52 \cdot \text{délka (v nejdelší ose)} \cdot \text{šířka v ose na ní kolmá}^2$  (Yu *et al.*, 2018).



Obr. 11: Celý nádor po vyjmutí z myši a fixaci. Přerušované čáry značí délky nádorů v nejdelší ose a ose na ni kolmé (vlevo). Na průřezu nádoru je vidět centrum nádoru (CT) a oblast kde nádor prorůstá do okolní tkáně – invazní okraj (IM) (vpravo). 1mm či 250 μm řezy byly připraveny tak, aby obsahovaly centrum nádoru tak invazní okraj. Zeiss Axiozoom V.16 s PlanNeofluoar Z 0.5x/0.125. Měřítka 10 mm.

#### 4.2.4 KONJUGACE PROTILÁTEK

Pro konjugaci protilátek byly použity NHS (5(6)-SFX fluorescein a Janelia Fluor 646) případně SDP (Alexa Fluor 488) estery fluoroforů, které se váží na primární aminy zejména lysinových zbytků aminokyselin v proteinech (v našem případě protilátek) (Sunasee *et al.*, 2014). Vzhledem k tomu, že mechanismem reaktivity primárních aminů je jejich nukleofilita (Sunasee *et al.*, 2014), konjugace se provádí v mírně bazickém pH, zajištěném bikarbonátovým pufrům s vhodným pH. 1M roztok bikarbonátového pufru byl připraven rozpuštěním 1,01 g bezvodého Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 3,4 g NaHCO<sub>3</sub> v 50 ml vody, pH 8,3 bylo zajištěno přidáním vhodného množství roztoku 1M NaOH za současného měření pH.

##### 4.2.4.1 KONJUGACE PROTILÁTEK S ALEXA FLUOR™ 488

Zásobní 10mM roztok fluoroforu byl připraven rozpuštěním 1 mg flurochromu v 121,1 µL bezvodého (skladováno s molekulárními síty) DMSO. Na pět objemových dílů purifikované protilátky byl přidán jeden díl 1M bikarbonátového pufru s pH 8,3. Protilátka s pufrům byla přenesena do čisté 1,5ml centrifugační mikrozkušavky a centrifugována 5 minut při 3000 G. Protilátka byla přenesena do čisté 1,5ml centrifugační zkumavky a za stálého míchání byl přidán zásobní roztok fluoroforu v objemu odpovídajícím specifickému molárnímu množství fluoroforu v poměru k molárnímu množství protilátky.

Vzhledem k tomu, že efektivita konjugace (množství navázaných molekul fluoroforu na molekulu protilátky) je závislá na koncentraci protilátky, která byla v našem případě odlišná od koncentrace doporučené v protokolu (viz konjugace s konkrétními fluorofory), byl molární poměr stanoven pomocí vztahu:

$y = 35,178 \cdot x^{-0,584}$  kde x je koncentrace IgG v mg/ml a y je poměr molárního množství fluoroforu k molárnímu množství protilátky.

Pro všechny protilátky jejichž koncentrace byla nad hranicí minimální doporučené koncentrace protilátky pro konjugaci v originálním protokolu (2 mg/ml), korespondovaly molární poměry fluoroforu vypočtené dle rovnice výše molárnímu poměru v originálním protokolu (molární poměr v originálním protokolu: 18:1, použité molární poměry dle rovnice: 14,8:1 pro TCRβ, 16,2:1 pro Thy 1.2). Pro CD4 protilátku jejíž koncentrace je pod hranicí minimální doporučené koncentrace v originálním protokolu, byl použit molární poměr fluoroforu vůči protilátce 40,1:1.

Směs protilátky s fluoroforem byla inkubována jednu hodinu ve tmě při RT (RT z anglického „room temperature“) a při 500 G. Konjugační reakce byla inhibována přidáním hydroxylaminu do finální koncentrace 150mM. Protilátka konjugovaná s fluoroforem byla centrifugována 5 minut při 3000 G a poté přenesena do neprůhledné centrifugační zkumavky.



#### 4.2.4.2 KONJUGACE PROTILÁTEK S 5(6)-SFX (FLUORESCEIN)

Postup pro konjugaci protilátek s fluoresceinem byl stejný jako pro fluorofor Alexa Fluor 488 s těmito rozdíly: 10 mM zásobní roztok byl připraven rozpuštěním 1 mg fluoroforu v 256,8  $\mu$ L bezvodého DMSO.

Pro vypočtení námi použitého molárního poměru fluoroforu vůči proteinu byla využita rovnice uvedená výše. Pro CD4 protilátku, jejíž koncentrace (3 mg/ml) byla nad minimální doporučenou hranicí (2 mg/ml) pro reakci, korespondoval molární poměr vypočtený dle rovnice (21,1:1) molárnímu poměru v protokolu (15:1). Pro TCR $\beta$  protilátku, která byla v nižší koncentraci, než uvádí protokol (0,3 mg/ml), byl použitý molární poměr na základě rovnice 81:1.

#### 4.2.4.3 KONJUGACE PROTILÁTEK S JANELIA FLUOR 646

Postup konjugace byl obdobný jako pro fluorofor Alexa Fluor 488 s těmito rozdíly: zásobní roztok fluoroforu Janelia Fluor 646 byl připraven v 5mM koncentraci, vzhledem k nižší rozpustnosti fluoroforu v DMSO.

I v tomto případě byla doporučená minimální koncentrace protilátky dle originálního protokolu 2 mg/ml, a pro protilátky, které tuto podmínku splňovaly byly použity molární poměry vypočtené dle rovnice výše a tyto korespondovaly s poměry v originálním protokolu (molární poměr v originálním protokolu: 15:1, použité molární poměry dle rovnice: 14,8:1 pro TCR $\beta$ , 15,2:1 pro CD24, 16,2 pro Gr-1). Pro CD4 protilátku byl opět vzhledem k její nižší koncentraci použit větší molární poměr fluoroforu dle rovnice, tedy 40,1:1.

Místo hydroxylaminu bylo pro inhibici reakce využito přidání glycinu do finální koncentrace 100 mM (hydroxylamin se ukázal jako nekompatibilní se značením tímto fluoroforem).

#### 4.2.5 OVĚŘENÍ ZNAČENÍ PROTILÁTEK POMOCÍ TITRACE

Pro ověření toho, zda došlo ke konjugaci protilátek s fluorofory a pro titraci protilátek za účelem zjištění ideální koncentrace pro další použití, byly všechny použité protilátky titrovány na splenocytech získaných disociací myších slezin z BALB/c a C57Bl6 myši.

#### 4.2.6 IZOLACE SPLENOCYTŮ PRO TITRACI PROTILÁTEK S VYUŽITÍM PRŮTOKOVÉ

##### CYTOMETRIE.

Myši byly usmrceny kraniální dislokací a ihned poté jim byly vyjmuty sleziny a přemístěny do HBSS. Sleziny byly disociovány mechanicky nůžkami a opakovaným nasátím kusů tkáně do pipety či protlačení přes 40 $\mu$ m sítko pro homogenizaci tkání. Suspenze byla přemístěna do 15ml centrifugační zkumavky a centrifugována 15 minut při 300 G. Po odsátí supernatantu byla peleta resuspendována ve zmrazovacím médiu (RPMI médium s 50% FCS a 7,5% DMSO) a připraveny 1ml alikvoty (přibližně 10 milionů buněk) do zmrazovacích zkumavek. Suspenzi jsme postupně

zmrazovali po následujících krocích: 10 minut v RT, 20 minut v -20°C, 3 hodiny v -80°C a poté přemístění do -150°C.

#### 4.2.7 TITRACE PROTILÁTEK

Pro všechny titrační experimenty bylo pro ředění protilátek, barvení a promývání splenocytů využito 1x HBSS s 0,1% želatinou a 0,01% azidem sodným (HBSS-GA). Buňky byly těsně před titrací co nejrychleji rozmrazeny, resuspendovány v 15 ml HBSS-GA, centrifugovány při 200 G 15 minut a resuspendovány v 1 ml HBSS-GA.

Titrace byly prováděny v 96jamkové destičce. Do deseti jamek byly připraveny ředící řady, se vždy poloviční koncentrací protilátky v objemu 10  $\mu$ l v následující jamce (v první a dvanácté jamce byly ponechána jako kontrola buňky pouze s HBSS-GA bez protilátky). Do takto připravené destičky bylo do každé z jamek přeneseno 10  $\mu$ l suspenze splenocytů (přibližně 100 000 buněk). Po 30 minutové inkubaci při 4°C s jednominutovým promícháním při 300RPM každých deset minut byly buňky centrifugovány 5 minut při 300 G, resuspendovány v 250  $\mu$ l HBSS-GA a znovu centrifugovány 5 minut při 300 G a resuspendovány ve 100  $\mu$ l HBSS-GA s barvením Hoechst 33342 v koncentraci 0,1  $\mu$ g/ml pro odlišení živých buněk. Po 10 minutách inkubace byly buňky měřeny na cytometru BD FACSverse.

#### 4.2.8 TESTOVÁNÍ KONJUGOVANÝCH PROTILÁTEK

Barvení protilátkami představuje časově nejnáročnější krok během projasňování, který je nutné provádět dvakrát v případě značení primárními a poté sekundárními protilátkami. Vzhledem k tomu bylo rozhodnuto využít purifikované primární protilátky a nakonjugovat je s fluorofory pro přímé značení tkáně. Tento postup byl již dříve využit pro značení projasněných tkání (Lee *et al.*, 2019, 2017).

Před značením protilátkami byla provedena rešerše fluoroforů (viz tab. 1) pro případné značení a vybrány ty které v poměru k ceně poskytovaly nejlepší vlastnosti pro mikroskopii, tedy zejména vysokou jasnost (kterou jsme vypočítali jako podíl extinkčního koeficientu a kvantového výtěžku) a které jsou fotostabilní.

Fluorofor	$\epsilon$	$\Phi$	Jasnost	Cena/mg
<b>Červený kanál</b>				
<b>Janelia Fluor 646, SE</b>	<b>152000</b>	<b>0,54</b>	<b>82,08</b>	<b>4656</b>
Atto 647N NHS ester	150000	0,65	97,5	10212
CF 640R amine	105000	0,37	38,85	7853
CF 647 amine	240000	n/a		7853

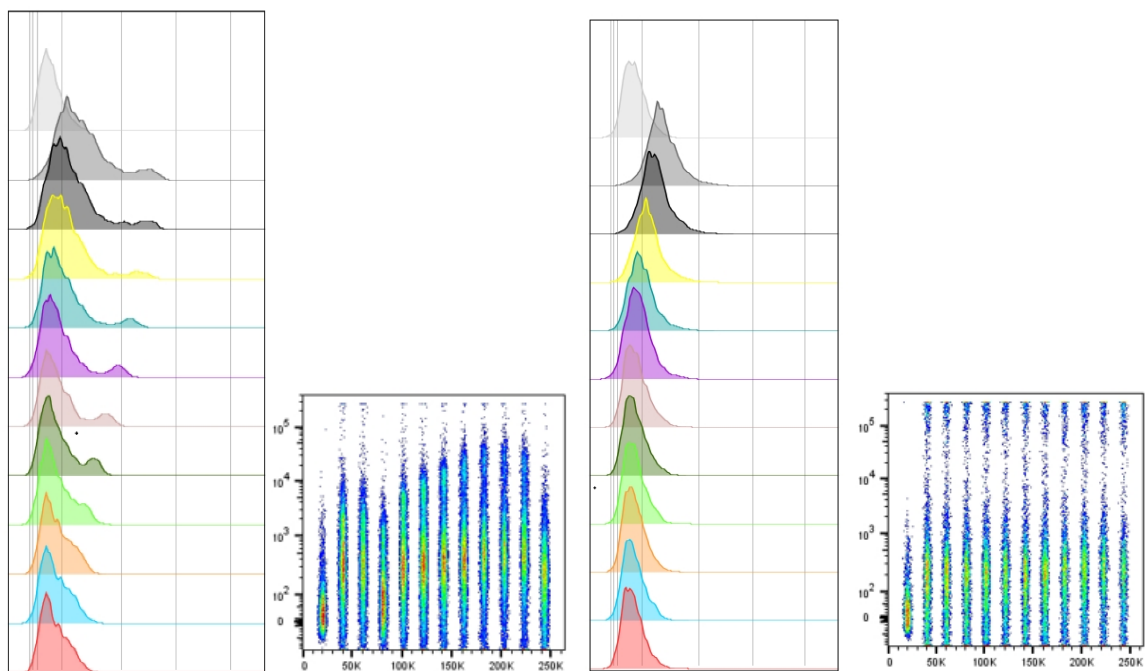
AF 647 azide	270000	0,33	89,1	24200
Cyanine 5, SE	250000	0,2	50	420
<b>Zelený kanál</b>				
Alexa Fluor™ 488 NHS Ester	73000	0,92	67,16	14133
<b>Alexa Fluor™ 488 5-SDP Ester</b>	<b>73000</b>	<b>0,92</b>	<b>67,16</b>	<b>11882</b>
Alexa Fluor™ 488 5-TFP	73000	0,92	67,16	13879
Andy Fluor™ 488 NHS Ester, SE	70000	n/a		8319
Alpha Fluor™ 488 NHS Ester	73000	0,92	67,16	5899
iFluor™ 488 succinimidyl ester	75000	0,9	67,5	5899
AFDye 488 NHS Ester	73000	n/a		4205
Atto 488	90000	0,8	72	7696
FITC	75000	0,92	69	37
<b>5(6)-SFX (Fluorescein), SE</b>	<b>74000</b>	<b>n/a</b>		<b>435</b>
TFAX 488, SE	73000	0,92	67,16	7775
OG 488	76000	0,9	68,4	1395
Abberior STAR 488	79000	0,89	70,31	10807

Tab. 1: Rešerše fluorofořů s jejich klíčovými vlastnostmi. Rozšířená tabulka včetně zdrojů jednotlivých produktů a detailů emisních a excitačních spekter viz příloha 1).

Pro pilotní experiment byl vybrán 5(6)-SFX (Fluorescein), SE) pro nízké náklady na značení. Pro finální konjugaci pro mikroskopii byl vybrán flurochrom Janelia Fluor 646, SE (ve vzdáleném červeném kanále) vzhledem k optimálnímu poměru ceny a jasnosti. V případě fluorofořu v zeleném kanále byla zvolena Alexa Fluor 488, a to zejména pro její dostupnost v podobě SDP esteru, který narozdíl od succinimidyl esterů nepodléhá během konjugace hydrolýze (Technical Tip: Greater Control and More Reaction Time with SDP Ester, 2007).

#### 4.2.8.1 KONJUGACE ANTI-CD4 (KLON YTS.177) A ANTI-TCR-BETA S FLUORESC EINEM

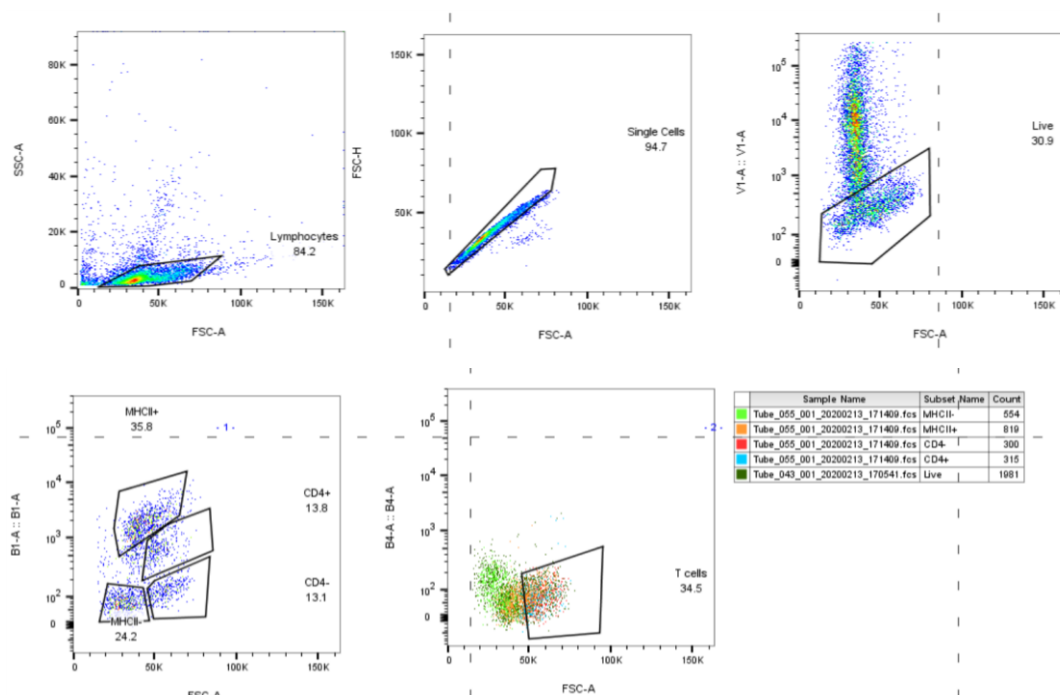
Pro pilotní experiment jsme zvolili konjugaci dvou protilátek (anti-CD4 a anti-TCR-beta) s flurochromem Fluoresceinem vzhledem k jeho většímu dostupnému množství a nižší pořizovací ceně.



Obr. 12: Titrace anti-CD4 (histogramy vlevo) a kontrolní doznačení sekundární protilátkou (bodový graf vlevo) a anti-TCR-beta (histogramy vpravo) a kontrolní doznačení sekundární protilátkou (bodový graf vpravo) protilátek konjugovaných s Fluoresceinem.

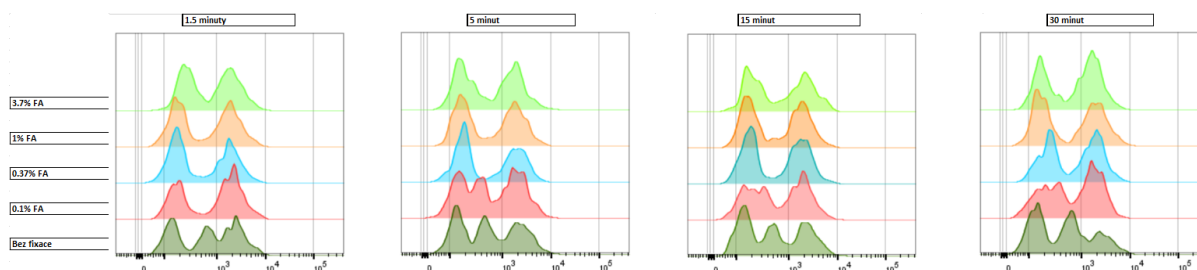
V případě anti-CD4 protilátky byla konjugace úspěšná, na základě dalších experimentů (viz níže, obr. 14) bylo zjištěno, že tento klon není kompatibilní s fixovaným materiálem a pro naše účely jej tedy nelze použít. V případě anti-TCR protilátky ke konjugaci nedošlo, s největší pravděpodobností z důvodu nízké vstupní koncentrace protilátky, která je násobně nižší (0,3 mg/ml) než minimální doporučená koncentrace (2 mg/ml).

#### 4.2.8.2 OVĚŘENÍ KOMPATIBILITY ANTI-CD4 S FIXACÍ



Obr. 13: Gatovací strategie pro tento experiment.

Pro tento experiment jsme použili splenocyty z MHCII-EGFP pozitivních myší. Vzhledem k tomu, že signál z GFP je o řád vyšší, než signál z fluoresceinem značené protilátky, je možné v takto gatovaných vzorcích odlišit signál z fluoresceinem značené anti-CD4 protilátky.



Obr. 14.: Vliv fixace na protilátku byl otestován na buňkách fixovaných čtyřmi různými koncentracemi formaldehydu a při čtyřech různých časech inkubace. Zatímco v nefixovaných vzorcích je viditelná intermediální populace CD4+ buněk, ve vzorcích fixovaných formaldehydem tato populace chybí. To potvrdilo nekompatibilitu klonu anti-CD4 YTS 177 s fixací.

Vzhledem k výše zjištěným skutečnostem byl v případě anti-CD4 zvolen jiný klon protilátky (GK 1.5), u které byla předem ověřena v literatuře její kompatibilita s formaldehydovou fixací (Satake *et al.*, 2010) a v případě TCR-beta byl zajištěn stejný klon, opět v literatuře ověřený pro kompatibilitu s formaldehydovou fixací (Lal *et al.*, 2006)) s vyšší koncentrací, přesahující minimální doporučenou koncentraci pro značení všemi použitými fluorofory. Zároveň jsme

značili i další protilátky (anti-CD24 s anti-Thy 1.2), které by v případě neúspěchu značení prvním párem protilátek posloužily ke značení tkáně na T a B buňky (Mlecnik *et al.*, 2018).

#### 4.2.8.3 KONJUGACE A TITRACE ANTI-CD4 (KLON GK1.5), ANTI-TCR-BETA, ANTI-CD24 A ANTI-THY 1.2 S ALEXA FLUOR 488 A JANELIA FLUOR 646

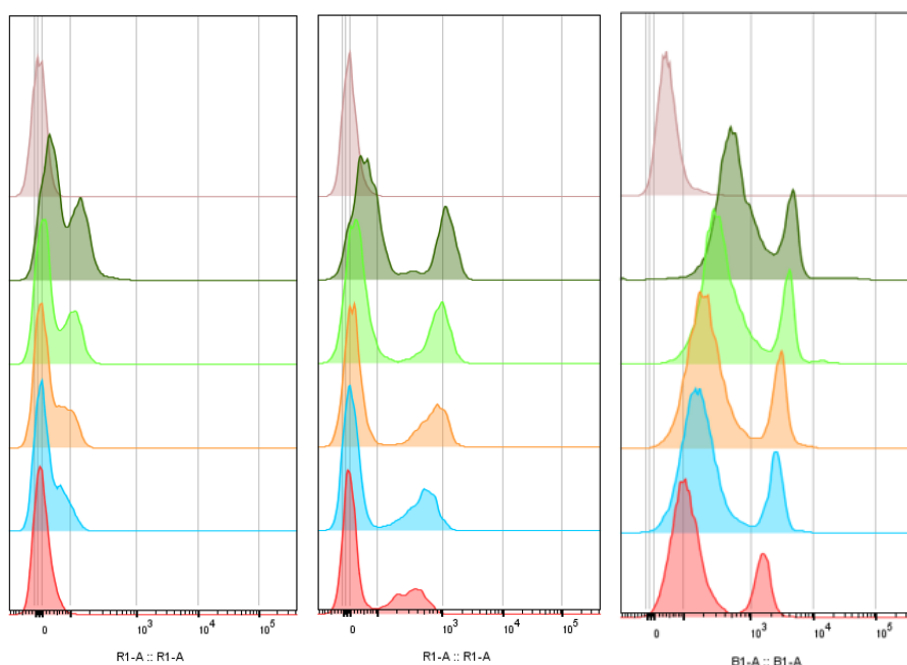
Všechny čtyři klony protilátek byly konjugovány s jedním z fluoroforů. Při všech konjugacích byly testovány tři molární poměry protilátky vůči fluoroforu (optimální dle výše uvedené rovnice, třikrát větší množství fluoroforu a třikrát větší množství protilátky). V případě negativního výsledku byla funkčnost purifikované i konjugované protilátky ověřena značením sekundární protilátkou. Zároveň byly purifikované i značené protilátky otestovány na kompatibilitu z fixací formaldehydem.

Na základě titračních experimentů bylo rozhodnuto pokračovat se dvěma protilátkami: anti-TCR-beta, která po konjugaci s Alexa Fluor 488 fluoroforem umožňovala značení všech T buněk, a to i na fixovaném materiálu, a je tedy alternativou k CD3 znaku. Druhou protilátkou byla anti-CD4, jejíž značení sekundární protilátkou potvrdilo její funkčnost na živých buňkách i fixovaném materiálu, ale nepovedlo se ji nakonjugovat s Janelia Fluor 646. Dalším krokem tedy bylo vyřešit značení fluoroforem Janelia Fluor 646.

#### 4.2.8.4 OVĚŘENÍ KONJUGACE PROTILÁTEK ANTI-TCR-BETA A ANTI-CD4

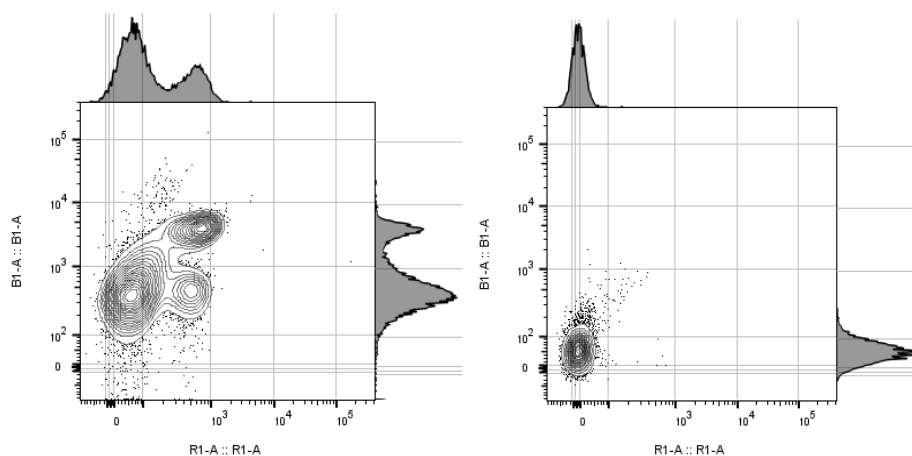
Vzhledem k tomu, že jedinou odchylkou od originálního protokolu bylo v přechodím experimentu použití hydroxylaminu namísto glycinu pro terminaci konjugace Janelia Fluor 646, bylo rozhodnuto ověřit, zda právě hydroxylamin je důvodem neúspěšné konjugace.

Zároveň byla značena protilátka anti-CD4 fluoroforem Alexa fluor 488, u kterého nebyl pochyb o jeho funkčnosti, díky přechodímu experimentu, ve kterém byla úspěšně naznačena anti-TCR-beta protilátka. Díky tomu bylo možné ověřit, zda problémem není samotná anti-CD4 protilátka respektive její konjugace.



Obr. 15: Titrace protilátky anti-TCR-beta značené fluoroforem Janlia Fluor 646 s využitím hydroxylaminu (vlevo) či glycinu (uprostřed) pro terminaci reakce. Tento experiment potvrdil hypotézu, že hydroxylamin má negativní vliv na konjugaci. Zároveň bylo konjugací a titrací anti-CD4 protilátky (vpravo) s Alexa Fluor 488 potvrzeno, že problémem v předchozím experimentu byla konjugační reakce, a nikoliv protilátka samotná.

Výsledkem těchto experimentů byly úspěšně konjugované protilátky anti-TCR-beta s Janlia Fluor 646 a anti-CD4 s Alexa Fluor 488, které umožňovaly odlišení T buněk a z nich subpopulace CD4+ buněk.



Obr. 16: Suspenze splenocytů označená TCR-beta v R1 kanále (osa X, značí všechny T buňky) a CD4 v B1 kanále (osa Y, značí CD4+ T lymfocyty) vlevo a korespondující negativní kontrola vpravo.

#### 4.2.9 FIXACE MYŠÍCH SPLENOCYTŮ

Před zpracováním tkání pomocí projasňovacích metod je vždy nutná jejich fixace v roztoku formaldehydu, která ale může vést k nekompatibilitě s některými protilátkami. Ačkoliv některé z námi používaných protilátek byly již jinými laboratoři využity na fixované tkáni (klony anti-CD4 GK 1.5 (Satake *et al.*, 2010), anti-TCR-beta H57-597 (Lal *et al.*, 2006), anti-Ly6g RB6-8C5 (Fixation. BioLegend, 2020), byly protilátky vybrané pro barvení projasněných tkání na fixovaném materiálu otestovány.

Využit byl stejný materiál jako v případě titračních experimentů (myší splenocyty uchované v -150°C). Buňky byly co nejrychleji rozmrazeny a resuspendovány v 15 ml HBSS-GA, centrifugovány při 200 G 15 minut a resuspendovány v 1 ml HBSS-GA. Poté jsme suspenzi buněk fixovali přidáním 9 ml 3,7% formaldehydu a inkubací 15 minut při RT. Nenavázaný formaldehyd byl zablokován přidáním nadbytku 1% roztoku glycinu do objemu 10 ml. Poté byly fixované buňky centrifugovány a resuspendovány v HBSS-GA do objemu odpovídajícímu objemu suspenze před fixací.

#### 4.2.10 ŘEZÁNÍ TKÁNÍ NA VIBRATOMU

Pro další experimenty byly jak z modelových tkání (slezina, lymfatická uzlina, mozek), tak z nádorové tkáně vytvořeny 1mm, případně 250µm řezy pomocí vibratomu Leica. V případě přípravy z tkání skladovaných v -80 °C byly tkáně rozmrazeny, opláchnuty od zbytků zmrazovacího média v PBS a poté promyty 2x hodinu v PBS. Tkáně byly opatrně osušeny a posléze zality do 4% agarózy s nízkou teplotou tuhnutí (LMA) při teplotě 37°C (nižší koncentrace LMA se neosvědčily vzhledem k tomu, že se vzorky během řezání uvolňovaly z agarózového bloku). Agarózový blok s tkání byl pro zpolymerizování ponechán 20 minut v lednici a poté připevněn k držáku vzorků na vibratomu vteřinovým lepidlem. V následujícím kroku byly tkáně řezány na požadovanou tloušťku s nastavením rychlosti řezání 0,5 mm/s pro 1mm řezy a 0,2 mm/s pro 250 µm řezy v amplitudách 1 mm pro 1 mm řezy a 0,5 mm pro 250 µm řezy. Řezy byly okamžitě přemístěny do PBS. Veškeré kroky byly prováděny na ledu v PBS zchlazeném na 4°C.

#### 4.2.11 PROJASŇOVÁNÍ TKÁNÍ

Za účelem otestování tří různých chemických přístupů pro projasňování byly testovány tři různé protokoly. CUBIC založený na hyperhydrataci vzorků a použití aminolakoholů (Susaki *et al.*, 2015). 3DISCO založený na použití organických rozpouštědel (Ertürk *et al.*, 2014) A komerční sadu (Tissue Clearing Kit) založenou na principu pasivní CLARITY (PACT), tedy tvorby hydrogelu a následné delipidace detergentem prostou difuzí (Yang *et al.*, 2014).



#### 4.2.11.1 PROJASŇOVÁNÍ TKÁNÍ POMOCÍ CUBIC METODY

Pro projasňování tkání byla využita inkubace v sérii roztoků močoviny, sacharózy, detergentu a aminoalkoholů (konkrétní složení viz následující odstavce) dále označovaných jako roztok CUBIC-1 a roztok CUBIC-2 dle Susaki *et al.* (2015).

Roztok CUBIC-1 byl připraven rozpuštěním 12,5 g močoviny, 15,6 g 80% vodného roztoku Quadrolu v 14,4 g dH<sub>2</sub>O v 50ml centrifugační zkumavce. Směs byla 20 minut či do rozpuštění všech složek roztoku inkubována při 1000 RPM a 100 °C. Poté byl roztok zchlazen na 37 °C a bylo přidáno 7,5 g Tritonu X-100 a roztok vortexován 1 minutu. Zkumavka byla centrifugována při 300 G a 37 °C jednu minutu a poté vizuálně ověřena homogenita roztoku. 50% roztok CUBIC-1 byl připraven smícháním 15 ml roztoku CUBIC-1 s 15 ml H<sub>2</sub>O v 50ml centrifugační zkumavce, následně byla směs jednu minutu vortexována a poté zkumavka centrifugována při 300 G a 37 °C 1 minutu a vizuálně ověřena homogenita roztoku.

Složení roztoku CUBIC-2 bylo oproti původnímu protokolu mírně upraveno rozpuštěním reagensů ve větším množství vody. Rozpuštěním ve větším množství vody došlo ke snížení refrakčního indexu z 1,49 na přibližně 1,48 (zpravidla 1,477) tak, aby odpovídal korekci objektivu na mikroskopu Zeiss Z.1. Přesné sjednocení indexu lomu zobrazovacího média a použitého objektivu je kritické pro kvalitu výsledného obrazu.(Carraro *et al.*, 2015) Výhodou je i menší viskozita takto připraveného roztoku, která usnadňuje manipulaci se vzorkem a jeho zobrazování. Roztok CUBIC-2 byl připraven rozpuštěním 12,5 g močoviny a 25 g sacharózy v 11 g dH<sub>2</sub>O v 50ml centrifugační zkumavce. Směs byla 20 minut či do rozpuštění všech složek roztoku inkubována při 1000 RPM a 100°C. Poté byl zchlazen na 37 °C a bylo přidáno 5 g trietanolaminu (TEA) a roztok vortexován 1 minutu. Zkumavka byla centrifugována při 300 G jednu minutu a poté byla vizuálně ověřena homogenita roztoku. 50% vodný roztok CUBIC-2 byl připraven obdobně jako v případě 50% CUBIC-1 roztoku.

Následující kroky popisují projasnění 1mm řezu tkáně, případně celé lymfatické uzliny. Při projasňování tenčích řezů (250 µm) byly objemy reagensů a časy inkubace zkráceny na čtvrtinu. Tkáně byly rozmrazeny v RT, opláchnuty PBS od zbytků zmrazovacího média a promyty 2x 1 hodinu v PBS v RT. Poté byly vzorky postupně inkubovány 6 hodin v 1,5 ml 50% CUBIC-1 při 37 °C a 300 RPM, 12 hodin v 1,5 ml CUBIC-1 při 37°C, 3x 30 minut v 1,5 ml PBS v RT, 6 hodin v 1,5 ml 50% CUBIC-2 při 37°C a 300 RPM a 12 hodin v 1,5 ml CUBIC-2 při 37°C a 300 RPM. Vzorky byly do zobrazování skladovány v CUBIC-2 roztoku ve tmě při RT. Nádoby se vzorky byly utěsněny parafílem pro zabránění odpařování média.

#### 4.2.11.2 MODIFIKACE CUBIC PROTOKOLU PRO BARVENÍ POUZE FLUORESCENČNÍMI BARVIVY (MALÉ MOLEKULY)

Při barvení pouze malými molekulami, které dobře difundují tkání, je protokol upraven následovně: do roztoku CUBIC-1 bylo přidáno 5 µg/ml Hoechst 33342, 300 nM DAPI či 5 µg/ml PI a inkubován, jak je popsáno výše. Vzorky jsme pak byly promývány 1x 30 minut v PBS v RT, poté 8 hodin v PBS při RT a poté 30 minut v PBS při RT, před pokračováním v inkubaci s 50% CUBIC-2 (v případě značení PI, byl přidán ve stejné koncentraci i při promývání vzorku v PBS).

#### 4.2.11.3 MODIFIKACE CUBIC PROTOKOLU PRO BARVENÍ PROTILÁTKAMI

Barvení protilátkami je v případě CUBIC protokolu řazeno mezi inkubaci v CUBIC-1 a CUBIC-2 roztoku (Susaki *et al.*, 2015). Po výše popsané inkubaci v CUBIC-1 roztocích a promytí 3x v PBS byly vzorky inkubovány v 30% roztoku sacharózy při 4 °C 6 hodin, poté přemístěny do zmrazovacího (O.T.C) média na suchém ledu a umístěny do -80 °C přes noc, případně déle. Poté byly vzorky rozmrazeny při RT, omyty PBS od zbytků zmrazovacího média a 3x 30 minut promyty při RT 1,5 ml PBS při 300 RPM. Tkáně byly značeny 1 ml roztoku protilátek v PBS s 0,1% Tritonem X-100, 0,5% BSA a 0,01% NaN<sub>3</sub> při 300 RPM (1 minutu každých 10 minut) 3 dny. Pokud byly tkáně dále značeny sekundárními protilátkami, byly promyty 5x 5ml 0,1% Tritonem X-100 v PBS jednu hodinu při 37°C a 300 RPM a poté barveny 1 ml roztoku sekundárních protilátek v PBS s 0,1% Tritonem X-100, 0,5% BSA a 0,01% NaN<sub>3</sub> při 300 RPM (1 minutu každých 10 minut) 3 dny. V případě barvení fluorescenčními barvivy byly tyto přidány do roztoků protilátek v požadované koncentraci. Po barvení následovalo promytí vzorků 5x 5 ml 0,1% Tritonu X-100 v PBS po dobu 1 hodiny při 37 °C při 300 RPM (1 minutu každých 10 minut) a poté inkubace v CUBIC-2 roztocích jak je popsáno výše.

#### 4.2.11.4 PROJASŇOVÁNÍ TKÁNÍ POMOCÍ ORGANICKÝCH ROZPOUŠTĚDEL

Vzorky byly projasňovány dle modifikovaného 3DISCO protokolu (Ertürk *et al.*, 2012; iDISCO protocol – iDISCO method., 2016; 2015; Renier *et al.*, 2014). Časy a množství reagensů jsou uvedeny pro projasnění 1mm řezů tkáně. Tkáně byly rozmrazeny při RT, opláchnuty PBS od zbytků zmrazovacího média a promyty 2x 1 hodinu v PBS při RT. Vzorky byly barveny před projasňováním, inkubací 90 minut při 4°C s v 1 ml PBS s 300nM DAPI nebo 5 µg/ml PI či 5 µg/ml Hoechst 33342. Další kroky zahrnující organická rozpouštědla byly prováděny v digestoři. THF bylo testováno na přítomnost peroxidů (ty jednak mohou mít vliv na kvalitu fluorescenčního signálu a zároveň představovat bezpečnostní riziko). Vzorky byly postupně inkubovány v 1 ml 50% tetrahydrofuranu (THF) 12 hodin, 1 ml 80% THF 2 hodiny, 1 ml 100% THF 3 hodiny, opláchnuty dichlormetanem (DCM), inkubovány ve 2 ml DCM dokud neklesly ke dnu a inkubovány ve 2 ml DBE 2 hodiny. V tom byly i skladovány při RT ve tmě.

Vzhledem k vysokému refrakčnímu indexu DBE ( $RI = 1,562$ ) musí být projasněné vzorky převedeny do roztoku s indexem lomu odpovídajícím korekci použitého objektivu ( $RI = 1,45 \pm 0,03$ ). Za tímto účelem byly vzorky inkubovány 15, 30 a 60 minut v 15 ml směsi DBE s etanolem v poměru 0,418:0,578 s výsledným indexem lomu 1,472 (Carraro *et al.*, 2015). Index lomu byl zkontrolován pomocí refraktometru a případně upraven přesně na uvedenou hodnotu přidáním etanolu či DBE (v případě, že byl index lomu příliš vysoký či nízký).

#### 4.2.11.5 PROJASŇOVÁNÍ TKÁNÍ KOMERČNÍ SADOU ZALOŽENOU NA POLYMERACI HYDROGELU

Vzorky byly projasňovány komerční sadou roztoků pro pasivní CLARITY (PACT) podle přiloženého protokolu (Tissue Clearing Kit). Časy a množství reagensů jsou uvedeny pro projasnění 1mm řezů tkáně. Tkáně byly rozmrazeny při RT, opláchnuty PBS od zbytků zmrazovacího média a promyty 2x 1 hodinu v PBS při RT. V dalším kroku byly inkubovány 6 hodin při 4°C v 0,8 ml fixačního roztoku („fixing solution“), 12 hodin při 35°C a 300 RPM v 1 ml roztoku pro projasňování tkáně („clearing solution“) a 6 hodin v roztoku při 4°C a 300 RPM v promývacím roztoku („washing solution“). Vzhledem k absenci roztoku pro sjednocení indexu lomu v komerční sadě byl využit postup pro sjednocení indexu lomu PACT vzorků dle publikovaného protokolu (Yang *et al.*, 2014): tkáně byly promyty při RT 24 hodin v PBS, značeny 1 hodinu ve 2 ml 300nM DAPI nebo 5 µg/ml PI či 5 µg/ml Hoechst 33342 v PBS při RT a 300 RPM, promyty čtyřikrát v PBS a inkubovány v 1 ml 70% sorbitolu po 12 hodin při 35°C a 300 RPM. Vzorky byly skladovány a zobrazovány v 70% sorbitolu při RT ve tmě.

#### 4.2.12 MONTOVÁNÍ VZORKŮ PRO LIGHT-SHEET MIKROSKOPII

Vzorky pro zobrazování na mikroskopu Lightsheet Zeiss Z.1 jsou umísťovány do zobrazovací komůrky shora musí být uchyceny ke specializovanému držáku. V případě vzorků zpracovaných metodami PACT či CUBIC je finální roztok neagresivní a vzorek může být umístěn v zobrazovací komůrce přímo v roztoku. V případě 3DISCO metodiky je finální roztok, v němž je vzorek umístěn, korozivní a nesmí přijít do kontaktu s optikou mikroskopu. Vzorek tedy musí být uzavřen do skleněné kapiláry a tato umístěna do zobrazovací komůrky mikroskopu. Komůrka mikroskopu musí být naplněna médiem se stejným indexem lomu jako má vzorek a kapilára. Index lomu zároveň musí odpovídat korekci optiky mikroskopu.

V případě CUBIC a PACT projasněných vzorků byl měřen index lomu zobrazovacích médií (70% sorbitol či CUBIC-2), a pomocí korekčního kroužku na použitém objektivu (Clr Plan-Neofluar 20x/1.0 Corr  $nd=1.45$ ), který umožňuje přizpůsobení objektivu refrakčnímu indexu zobrazovacího media v rozsahu  $1,45 \pm 0,03$ , byla nastavena odpovídající korekce.

V případě 3DISCO projasněných vzorků byly tyto umístěny do speciální skleněné kapiláry z boritokřemičitého skla, které má index lomu přesně 1,472. Uvnitř kapiláry byl vzorek umístěn v roztoku DBE a etanolu (viz kapitolu Projasňování tkání pomocí organických rozpouštědel). Komůrka byla v tomto případě naplněna roztokem CUBIC-2 s indexem lomu přesně 1,472 (v případě CUBIC-2 roztoku lze index lomu upravit na požadovanou hodnotu přidáváním destilované vody či TEA v případě příliš vysokého či nízkého indexu lomu).

#### 4.2.13 MĚŘENÍ INDEXU LOMU

Protože sjednocení indexů lomu je stěžejní pro kvalitu výsledného signálu a zamezení aberacím (cit.) byl tento měřen u všech roztoků určených pro zobrazování vzorků v lightsheet mikroskopu pomocí refraktometru. Jako referenční vzorek byla použita destilovaná voda ( $RI = 1,333$ ). Index lomu pro každý roztok byl měřen třikrát, výsledek byl průměrem tří měření. Pokud se hodnota jednotlivých měření odchylovala o více než 0.001, bylo měření indexu lomu zopakováno.

#### 4.2.14 MĚŘENÍ TRANSMITANCE

Transmitance tkání byla měřena na mikroskopu Zeiss Axiozoom V.16 jako poměr intenzity procházejícího světla v tkáni k intenzitě pozadí (Kim *et al.*, 2018). 1mm řezy tkání jsme umístili na podložní sklo do ~100  $\mu$ L média v němž jsou vzorky zobrazovány (70% sorbitol, CUBIC-2 či DBE/etanol) a přikryli krycím sklem. Pro vymezení vzdálenosti mezi krycím a podložním sklem tak, aby nedošlo k poškození tkáně bylo využito několik vrstev elektrikařské pásky, případně několik krycích skel menší velikosti umístěných na sebe. Oblast tkáně byla vybrána pomocí nástrojů „Wand“ či „Polygon selection“ (v případě samotného média byla vybrána kruhová oblast s  $d = 1$  mm, tak aby neobsahovala bubliny ani nečistoty) a intenzita světla byla měřena pomocí „Measure“ v SW FIJI. Jako pozadí bylo měřeno samotné zobrazovací médium, zamontované a měřené stejným způsobem jako vzorek.

#### 4.2.15 MĚŘENÍ DISTORZE OBRAZU S VYUŽITÍM FLUORESCENČNÍCH KULIČEK

1% roztok LMA byl připraven rozpuštěním 0,1 g práškové agarózy s nízkým bodem tuhnutí v 10 ml vody a zahřátím na 100°C. Agaróza s fluorescenčními kuličkami byla připravena přidáním 100  $\mu$ L fluorescenčních kuliček do 900  $\mu$ L 1% roztoku LMA schlazeného na 37°C v 1,5ml centrifugační zkumavce a následným zvortexováním. Roztok byl poté nasát do 1ml stříkačky s odstřiženou špičkou a ponechán 10 minut ve tmě při 4 °C pro zpolymerizování. Z takto připraveného bloku agarózy, byly odříznuty přibližně 1 cm dlouhé úseky, které byly dále ponechány ve vodě ve 4°C ve tmě, či přes noc v roztoku CUBIC-2 či 70% sorbitolu ve tmě při RT. Tyto byly následně nasáty do 1ml stříkačky s odstřiženou špičkou, v příslušném zobrazovacím médiu, a zobrazovány na lightsheet mikroskopu.

Ke kvantifikaci distorze obrazu bylo využito měření velikosti nasnímaných fluorescenčních kuliček s využitím makra v programu ImageJ. Následuje popis měření. Ve snímku fluorescenčních kuliček byla nejdříve provedena redukce dimenzionality pomocí projekce maximální intenzity buď v ose Z (pro měření hodnot v laterálním směru), či v ose XY případně XZ (pro měření hodnot v axiálním směru). Na takto vytvořených snímcích byl poté pomocí obdélníkového výběru zvolen region s fluorescenční kuličkou, a makrem změřena její velikost v obou osách (XY či XZ). Velikost kuličky byla aproximována jako FWHM (šířka čáry v polovině výšky z anglického „full width at half maximum“) Gausovy křivky aproximující intenzitní profil fluorescenční kuličky v dané ose (tento způsob měření velikosti objektu se standartně používá pro určení skutečného rozlišení mikroskopu či identifikaci optických vad (Booth and Wilson, 2001; Cole *et al.*, 2011)). Měření bylo pro každý vzorek a axiální či laterální orientaci zopakováno na desíti náhodně vybraných kuličkách.

#### 4.2.16 KVANTIFIKACE KVALITY SIGNÁLU V MIKROSKOPICKÝCH VZORCÍCH POMOCÍ STAINING INDEXU

Pro kvantitativní zhodnocení kvality signálu za účelem porovnání dvou mikroskopických metod byl využit staining index, parametr běžně požívaný v cytometrii. Staining index je vypočten jako rozdíl průměrné fluorescence signálu popředí a průměrné fluorescence signálu pozadí, dělený dvojnásobkem směrodatné odchylky pozadí. Pro data z lightsheet mikroskopu i z mikroskopu Axiozoom byla nejdříve redukována dimenzionalita v ose z pomocí projekce maximální intenzity. Ve snímcích byly posléze kvantifikovány průměrné intenzity signálu a jejich směrodatné odchylky a průměrné intenzity pozadí a jejich směrodatné odchylky. Za tímto účelem bylo vytvořeno makro v programu ImageJ (viz příloha 6). Naměřené hodnoty byly poté exportovány do programu Microsoft Excel. Zde byl spočítat staining index.

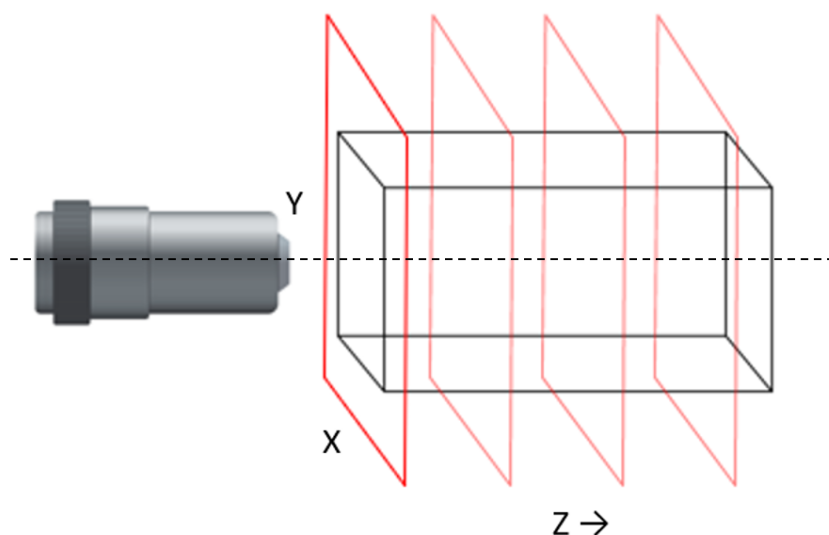
#### 4.2.17 MIKROSKOPIE

Pro screening vzorků před samotným zobrazováním na light-sheet mikroskopu byl využit invertovaný mikroskop Leica DMi 8 vybavený 120W metalhalidovou lampou (Leica EL6000) a čtyřmi sety filtrů pro fluorescenční zobrazování v modrém (excitace 350/25, emise 460/25), zeleném (excitace 480/20, emise 527/15), oranžovém (excitace 560/20, emise 630/38) a červeném (excitace 620/30, emise 700/38) spektru, objektivy HCX FL PLAN 5x/0.12, HC FL PLAN 10x/0.25, HC FL PLAN 40x/0.65 a sCMOS detektorem Andor-Zyla 4.2 (rozlišení 2048 x 2048 pixelů, 16-bit), či mikroskop s variabilním zvětšením Axiozoom V.16 vybavený 120W metalhalidovou lampou (HXP 120 V), čtyřmi sety filtrů pro fluorescenční zobrazování v modrém (excitace 359/24, emise 445/25), zeleném (excitace 470/20, emise 525/25), oranžovém (excitace 872/13, emise 645/45) a červeném (excitace 640/15, emise 690/26) spektru a objektivy

PlanNeofluoar Z 0.5x/0.125, PlanNeofluoar Z 1x/0.25 a PlanNeofluoar Z 2.3x/0.57, CCD detektorem ZEISS Axiocam 512 (rozlišení 4248 x 2832 pixelů, 14-bit) mono a systémem ApoTome.2 umožňujícím post-akvizici redukcí pozadí u fluorescenčních vzorků na základě strukturované iluminace.

Pro lightsheet zobrazování byl využit mikroskop Zeiss Z.1 v Servisní laboratoři světelné mikroskopie na Ústavu molekulární genetiky AV ČR vybavený 405nm 50mW, 488nm 25mW, 561 20mW a 638nm 75 mW lasery, emisními filtry pro snímání v modrém (pásmový filtr 445/25), zeleném (pásmový filtr 525/20), oranžovém (pásmový filtr 595/20) a červeném (filtr propustný pro vlnové délky nad 650 nm) spektru, iluminačními objektivy Lightsheet Z.1 10x/0.2, detekčním objektivem Lightsheet Z.1 5x/0.16 a imerzními detekčními objektivy Lightsheet Z.1 20x/1.0 pro zobrazování ve vodě a Clr Plan-Neofluar 20x/1.0 pro zobrazování v médiích s refrakčním indexem 1.45 (+/- 0,03) a dvěma sCMOS detektory PCO.Edge 5.5 (2560 x 2160. 16-bit), a mikroskop Zeiss Z.1 v laboratoři konfokální a fluorescenční mikroskopie na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy s obdobnými specifikacemi.

Pro snazší orientaci v prezentovaných výsledcích v podobě obrazového výstupu je v celé kapitole používáno jednotné označení os v prostoru vzhledem k ose optické soustavy mikroskopu, tedy pomyslné přímce procházející středem objektivu (viz obr. 17).



*Obr. 17: konsenzus značení os používaný dále v této práci. Snímek v ose XY je v obou osách kolmý na osu optické soustavy (přerušovaná čára) – tedy takový, který je standartně zaznamenán na kameru jako jeden snímek v určité hloubce. Snímek v ose XZ či YZ je nazýván ortogonální projekcí a jde o „řez“ jednotlivými snímky v ose Z, který poskytuje náhled na vzorek od povrchu do hloubky (vzhledem k ose optické soustavy).*

#### 4.2.18 ANALÝZA OBRAZOVÝCH DAT

Snímky ve formátu CZI byly nejdříve zpracovány v programu ZEN 2014 for Lightsheet Z.1. Zde byla provedena fúze dvou sérií snímků iluminovaných z různých stran, případně vybrána série snímků iluminovaných z jedné strany. Vzhledem k nedokonalému zaostření iluminačních laserů do roviny ostrosti či jejich rozptylu v tkáni, byla kvalita obrazu u projasněných snímků zpravidla vyšší při použití série snímků iluminovaných pouze z jedné strany.

Pro potlačení pozadí jsme snímky dekonvolvovali v SW Huygens proffesional. Parametry dekonvoluce byly následující: odečtení pozadí automaticky ( $d = 5$ ), maximální počet iterací: 100, poměr signálu k šumu: 15, práh kvality: 0,01. Po dekonvoluci byly výsledné snímky vyexportovány v R3D formátu pro další zpracování.

Segmentaci buněk na základě membrán jsme prováděli dvoukrokově s pomocí SW ImageJ a Imaris následujícím postupem: snímky ve formátu R3D byly otevřeny v programu ImageJ a kanál určený k analýze byl pomocí funkce „duplicate“ oddělen od ostatních. Vybraný kanál byl zduplikován. Jedna kopie byla převedena z 32 bitového na 8 bitový formát, exportována ve formátu TIFF, převedena na formát IMS pomocí SW Imaris File Convertor. Z druhé kopie byla sérií kroků v programu ImageJ (viz příloha 2) vytvořena binární maska na základě invertovaného kanálu obsahujícího signál z membrán označených fluorescenčními protilátkami.(Li *et al.*, 2017) Binární maska byla vyexportována ve formátu TIFF, převedena na formát IMS pomocí SW Imaris File Convertor a importována do SW Imaris. Jako další kanál byl naimportován připravený 8 bitový snímek fluorescenčního signálu ve formátu IMS. V SW Imaris byly pomocí analytických nástrojů k detekci objektů vybrány oblasti binární masky odpovídající oblastem vysoké fluorescence (funkce „surfaces“ s nastavením prahu 100 a minimální velikosti 100 voxelu, kompletní nastavení viz příloha 6), z těchto byl vytvořen samostatný kanál a v něm byly analyzovány jednotlivé body (funkce „spots“ s nastavením prahu 50 a minimální průměrné intenzity 3 v kanále vytvořeném z 8 bitového snímku původní fluorescence, kompletní nastavení viz příloha 7).

Pomocí funkcí snapshot v Imaris, či exportu snímků z programu ImageJ byly vytvořeny ilustrativní snímky (pro tvorbu montáží vícekanálových snímků s histogramy bylo využito makro v příloze 3).

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 POROVNÁNÍ TŘECH RŮZNÝCH PROJASŇOVACÍCH PROTOKOLŮ Z HLEDISKA EFEKTIVITY ZPRŮHLEDNĚNÍ TKÁNĚ A KOMPATIBILITY S FLUORESCENČNÍMI BARVIVY

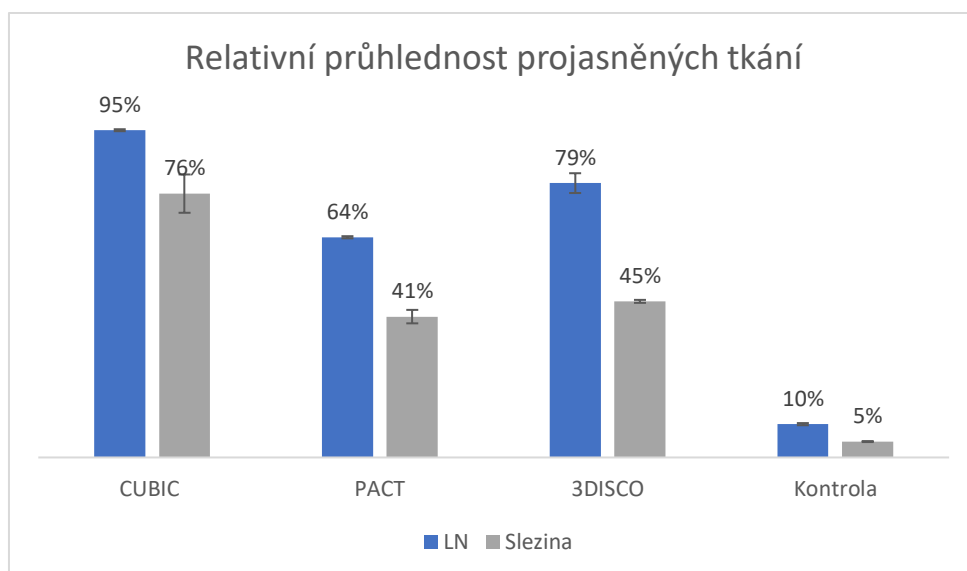
Tesotvány byly tři projasňovací protokoly, které odrážejí rozdílné chemické přístupy k projasnění tkáně: CUBIC metodu založenou na hyperhydrataci, PACT metodu založenou na transformaci tkáně a 3DISCO metodu založenou na použití organických rozpouštědel.

Vzhledem k budoucímu záměru značení tkáně protilátkami, byla jako základní značení vybírána fluorescenční barviva v modrém kanále (DAPI a Hoechst 33342). Modrý kanál je suboptimální vzhledem k většímu rozptylu světla a tím riziku ztráty signálu i v případě projasněných vzorků (Marx, 2016), protilátky byly proto preferenčně voleny v kanále zeleném a vzdáleném červeném. Ze stejného důvodu byl testován i propidium iodid (PI) emitující v červeném kanále, jako alternativa základního značení v případě zbytkového rozptylu světla zamezujícího detekci signálu v modrém kanále. Jako kontrola sloužila fluorescence GFP exprimovaného MHCII pozitivními buňkami vzhledem k využití tkání z MHCII/EGFP transgenních myší (viz použité modelové organismy v kapitole metodika). Tyto experimenty měly za cíl kvalitativní zhodnocení projasnění tkáně na základě vizuálního rozlišení označených jader a ověření kompatibility jednotlivých projasňovacích protokolů z různými druhy barvení malými fluorescenčními molekulami.

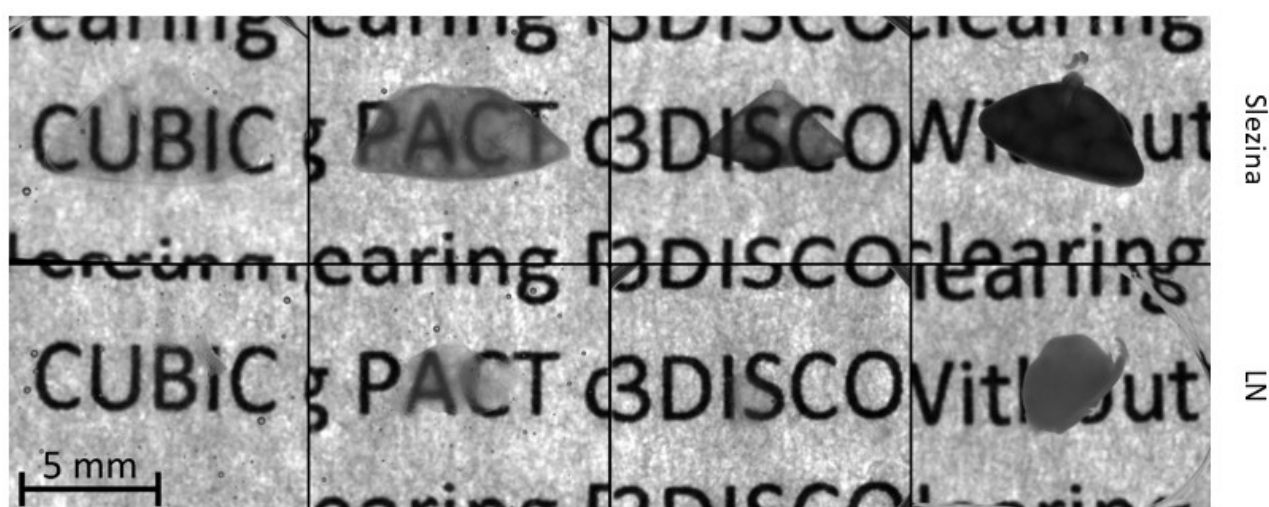
#### 5.1.1 POROVÁNÍ PROJASŇOVACÍCH PROTOKOLŮ Z HLEDISKA EFEKTIVITY ZPRŮHLEDNĚNÍ TKÁNĚ

Míra projasnění byla kvantifikována jako relativní transmitace (viz metodika) a to na dvou modelových tkáních lišících se zejména množstvím hemu, který je jednou z hlavních příčin neprůhlednosti tkání. Zároveň byly pro ilustraci nasnímány obě tkáně před projasněním a po projasnění jednotlivými protokoly (obr. 19).





Obrázek 18: Relativní průhlednost projasněných modelových tkání (1mm řez slezinou či lymfatická uzlina) z C57Bl6 myši.  $N = 3$ , chybové úsečky = SD. Zeiss Axiozoom V.16 s PlanNeofluoar Z 0.5x/0.125.



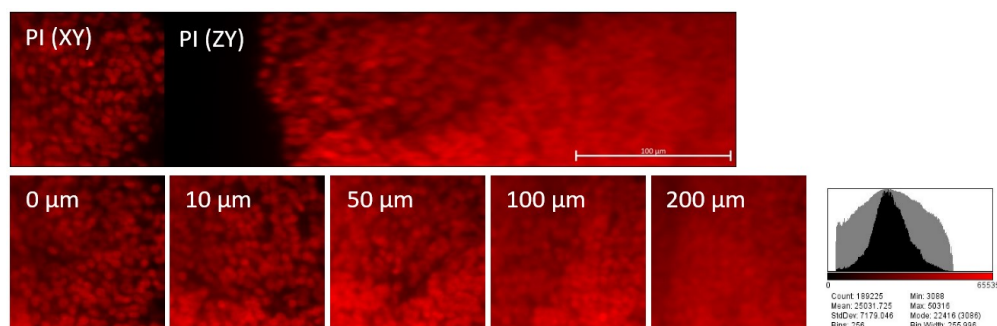
Obr. 19: Ilustrativní snímek průhlednosti 1mm řezů myši slezinou a celých lymfatických uzlin projasněných (zleva) CUBIC, PACT, 3DISCO v porovnání s neprojasněnou tkání (vpravo). Zeiss Axiozoom V.16 s PlanNeofluoar Z 0.5x/0.125.

Nejlepší projasnění obou modelových tkání poskytuje CUBIC metodika (viz obr. 17). V případě lymfatické uzliny je transmitance 95 % (v porovnání s 10 % v neprojasněné tkáni), u 1mm řezů slezinou je pak transmitance 76 % (v porovnání s 5 % v neprojasněné kontrole). U zbylých dvou projasňovacích metod bylo projasnění zejména v případě sleziny výrazně horší (transmitance 41 % u PACT a 45 % u 3DISCO) což koresponduje s tím, že součástí CUBIC metody je eluace hemu.

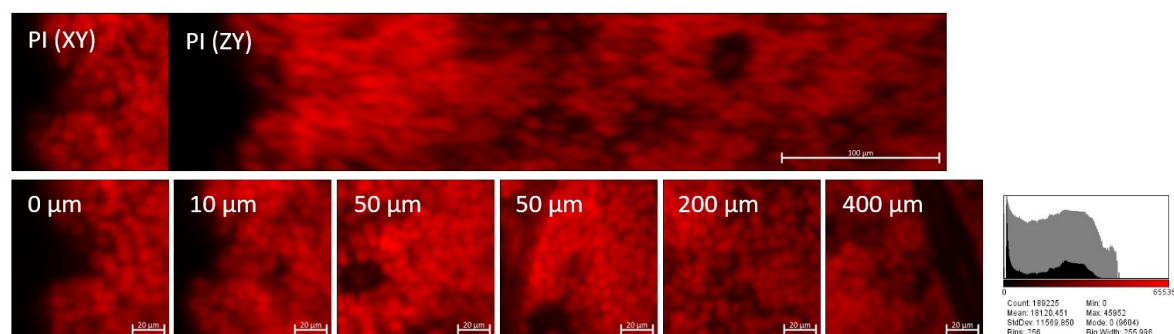
Kvalitativně byla ověřena průhlednost (tedy míra projasnění) tkání projasněných různými protokoly s využitím lightsheet mikroskopie detekcí signálu z jader značených PI v různých hloubkách v 1mm řezu slezinou (viz obr. 20). Největší transmitanci vzorků (viz obr. 18) a vizuálně

nejprůhlednějším vzorkům (viz obr. 19) odpovídala i nejmenší ztráta kvality signálu s hloubkou v případě CUBIC projasněných tkání. Zatímco u PACT projasněných vzorků přestávají být jádra zřetelná už ve 200  $\mu\text{m}$  hloubce od povrchu (viz obr. 19), u CUBIC projasněných vzorků jsou jádra zřetelná i v hloubce 400  $\mu\text{m}$  od povrchu.

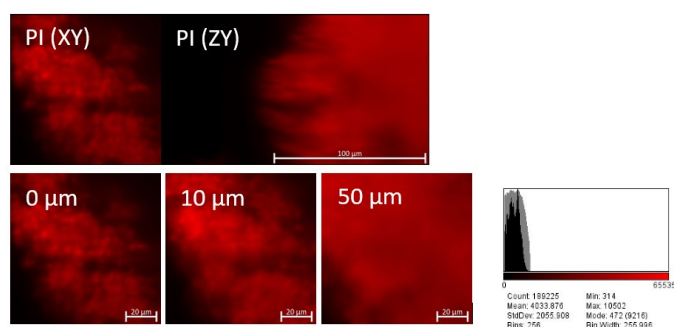
### PACT



### CUBIC



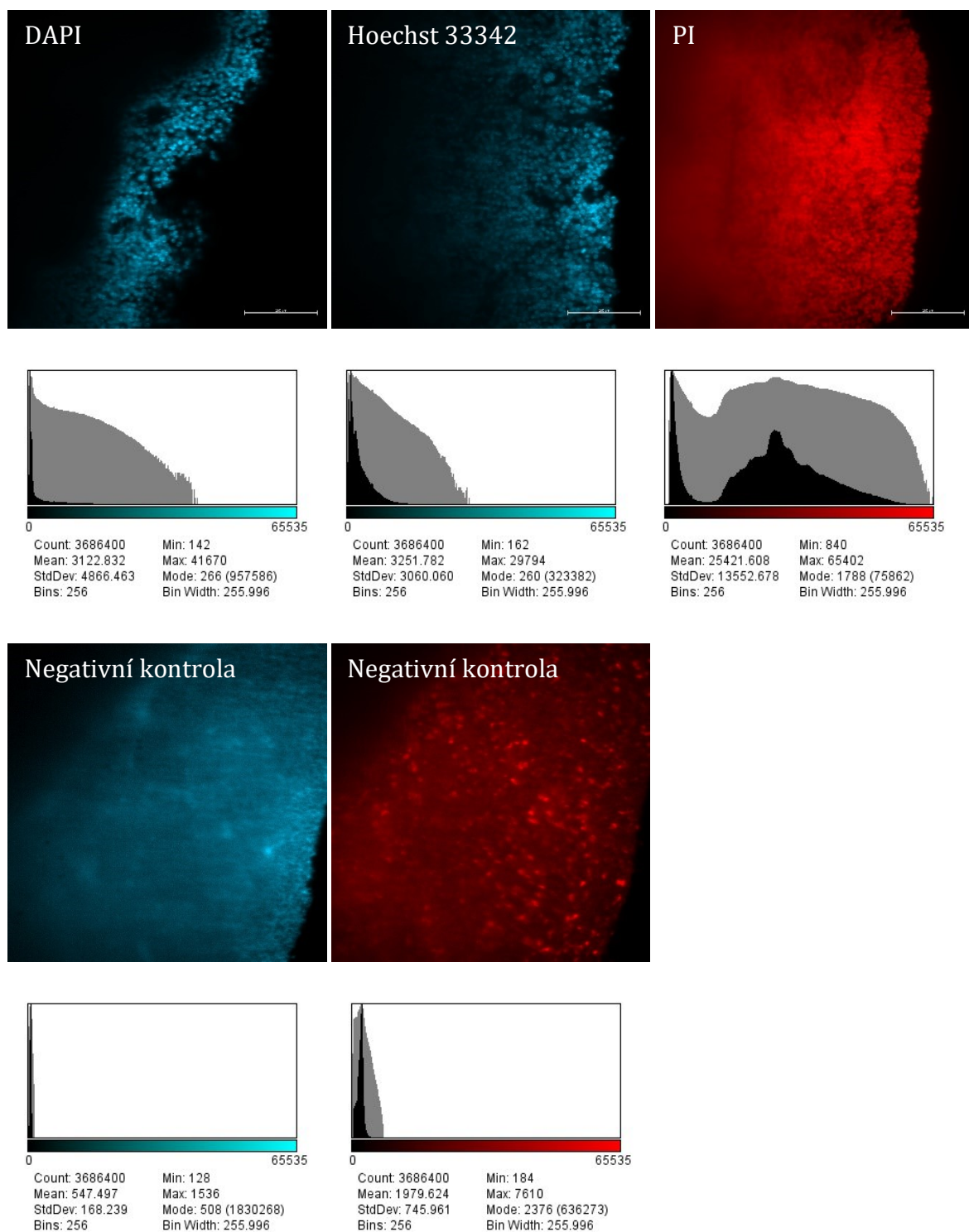
### 3DISCO



Obr. 20: kvalita signálu z jader značených PI v CUBIC, PACT či 3DISCO projasněných vzorcích v hloubkách 0, 10, 50, 100, 200 a 400  $\mu\text{m}$ ). Pro co nejilustrativnější náhled struktury jader je kontrast u všech snímků jednotlivých metod nastaven tak, aby byla vizuálně rozpoznatelná struktura jader (liší se mezi jednotlivými metodami). Absolutní intenzitu signálu ilustrují histogramy povrchových snímků vpravo. Mikroskop Zeiss Z.1 s Clr Plan-Neofluar 20x/1.0. Měřítka: 100  $\mu\text{m}$  v ose ZY, 20  $\mu\text{m}$  v ose XY.

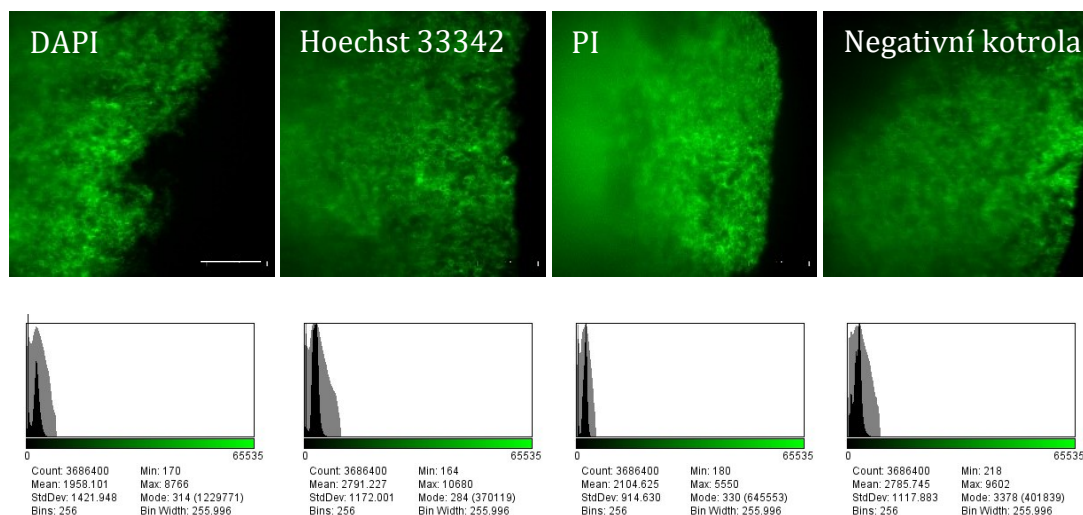
### 5.1.2 KOMPATIBILITA DAPI, HOECHST 33342 A PI ZNAČENÍ S PACT

I pro PACT projasňování byla testována kompatibilita s DAPI, Hoechst 33342 a PI značením jader na 1mm řezích MHCII/EGFP+ slezinou.



Obr. 21: Snímky (v ose XY) PACT projasněných 1mm řezů myší slezinou (MHCII/EGFP+ myši) značených DAPI, Hoechst 33342 či PI v ose XY z hloubky ~50  $\mu$ m a korespondujících neznačených kontrol. Kontrast u jednotlivých snímků je nastaven různě, za účelem efektivnější vizuální prezentace

dat. Absolutní intenzitu signálu ilustrují histogramy pod snímky. Mikroskop Zeiss Z.1 s Clr Plan-Neofluar 20x/1.0. Měřítka 250  $\mu\text{m}$ .

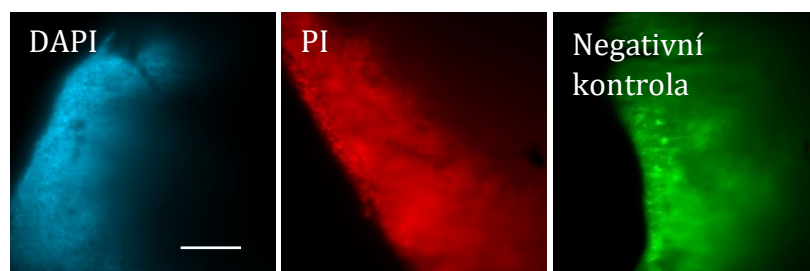


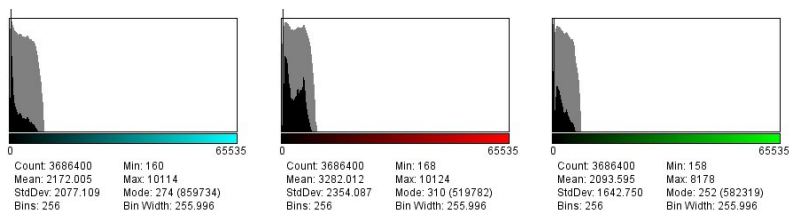
Obr. 22: Snímky membránově lokalizované fluorescence EGFP (v ose XY) v PACT projasněných 1mm řezech myši slezinou (MHCII/EGFP+ myši) značených DAPI, Hoechst 33342 či PI v ose XY z hloubky  $\sim 50 \mu\text{m}$  a korespondujících neznačených kontrol. Kontrast u jednotlivých snímků je nastaven různě, za účelem efektivnější vizuální prezentace dat. Absolutní intenzitu signálu ilustrují histogramy pod snímky. Mikroskop Zeiss Z.1 s Clr Plan-Neofluar 20x/1.0. Měřítka 250  $\mu\text{m}$ .

PACT metodika je kompatibilní se všemi použitými způsoby značení. Ztráta signálu (v případě DAPI a Hoechst 33342) či ztráta struktur (u PI a GFP) ve větších vzdálenostech od okraje (viz obr. 21 a 22) tkáně koresponduje s nedostatečným projasněním tkáně a větším rozptylem světla v ní (viz obr. 18 a 19).

### 5.1.3 KOMPATIBILITA DAPI, HOECHST 33342 A PI ZNAČENÍ S 3DISCO

V případě 3DISCO metody nebylo možné vizuálně zhodnotit kompatibilitu se značením jednotlivými barvivy vzhledem k výrazné aberaci a ztrátě kvality signálu, pravděpodobně z důvodu umístění vzorku do skleněné kapiláry (více v diskuzi). Nízkou kvalitu signálu ilustrují snímky GFP, DAPI a PI fluorescence (vzhledem k nízké kvalitě signálu, včetně modrého kanálu, nebyl v tomto případě snímán vzorek značený Hoechst 33342).

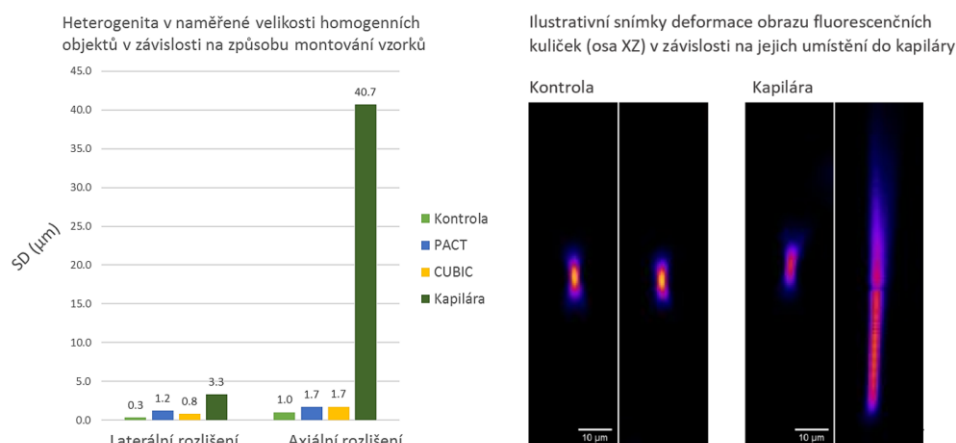




Obr. 23: Snímky projasněných 1mm řezů myši slezinou (MHCII/EGFP+ myši) značených DAPI, PI či neznačených (signál z EGFP). Absolutní intenzitu signálu ilustrují histogramy pod snímky. Mikroskop Zeiss Z.1 s Clr Plan-Neofluar 20x/1.0. Měřítka 250  $\mu\text{m}$ .

#### 5.1.4 POROVNÁNÍ PROJASŇOVACÍCH PROTOKOLŮ Z HLEDISKA VLIVU NA KVALITU SIGNÁLU

Pro kvantitativní ověření toho, zda je umístění vzorků do kapiláry důvodem distorze obrazu byly využity fluorescenční kuličky, umístěné do komůrky mikroskopu stejným způsobem jako vzorky. Tedy přímo do komůrky v příslušném médiu v případě PACT a CUBIC, či do kapiláry v případě 3DISCO. Poté byly snímány a byla měřena jejich velikost v laterálním i axiálním směru. Vzhledem ke stejné fyzické velikosti kuliček, odpovídají rozdíly v naměřených velikostech kuliček (zde vyjádřené směrodatnou odchylkou, SD) aberacím způsobeným montováním vzorku.

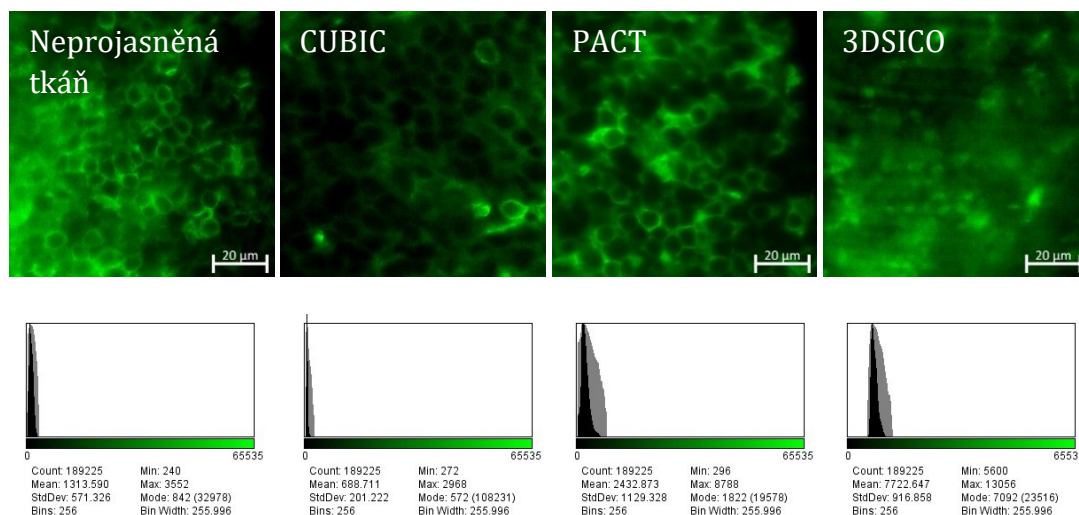


Obr. 24: Vlevo porovnání heterogenity v kvalitě obrazu v závislosti na lokalizaci měřeného objektu (fluorescenční kuličky), kvantifikované jako směrodatné odchylky v naměřených velikostech uniformních objektů ( $N = 10$ ). Vpravo ilustrativní snímek dvou vybraných fluorescenčních případů umístění vzorku přímo do komůrky mikroskopu (kontrola), vlevo v případě umístění do kapiláry. Mikroskop Zeiss Z.1, objektiv Plan-Neofluar 20x/1.0. Měřítka 250  $\mu\text{m}$ .

Rozdíl v naměřených velikostech jednotlivých kuliček (viz obr. 24) při jejich umístění do kapiláry (3,3  $\mu\text{m}$  v laterálním a 40,7  $\mu\text{m}$  v axiálním směru), je výrazně vyšší než při umístění přímo do komůrky (od 0,3 do 1,7  $\mu\text{m}$  v v axiálním i laterálním směru).



Umístění vzorku do kapiláry vede k distorzi obrazu a tím ztrátě rozlišení, jak ilustruje snímek membránově lokalizované GFP fluorescence (viz obr. 24).

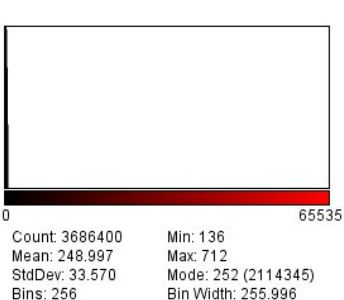
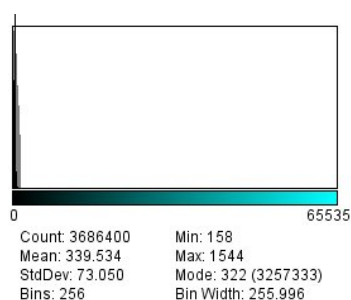
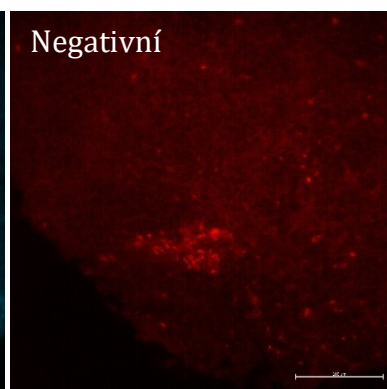
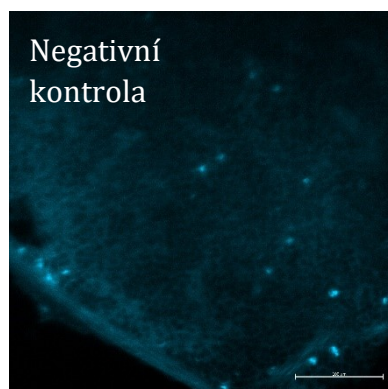
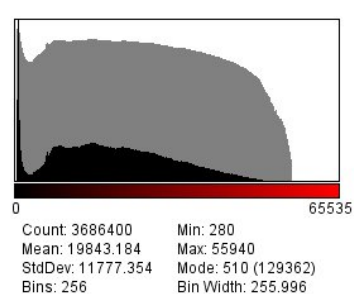
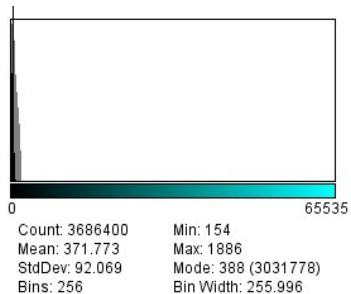
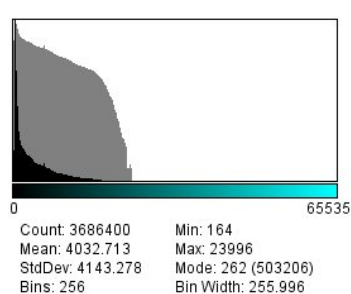
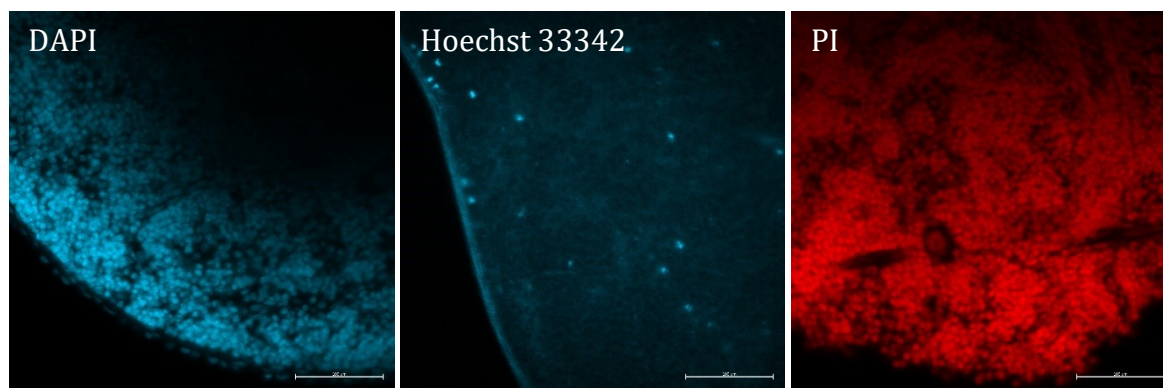


Obr. 25: Porovnání kvality membránově lokalizovaného signálu EGFP v 1mm řezů myší slezinou (MHCII/EGFP+ myši) zpracovaných pomocí různých projasňovacích protokolů. Kontrast u jednotlivých snímků je nastaven různě, za účelem efektivnější vizuální prezentace dat. Absolutní intenzitu signálu ilustrují histogramy pod snímky. Mikroskop Zeiss Z.1 s Clr Plan-Neofluar 20x/1.0 či Plan-Neofluar 20x/1.0. Měřítka 20 µm.

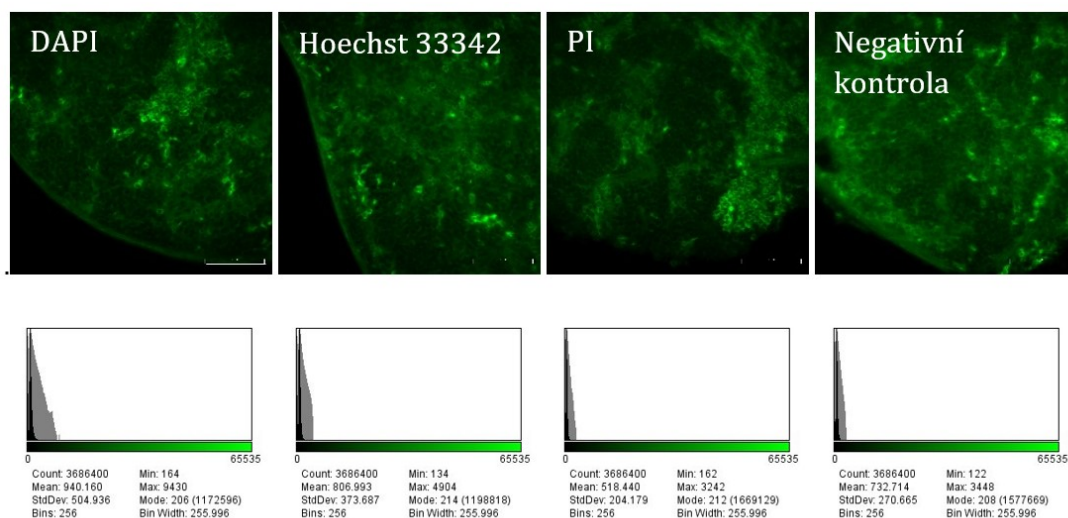
Ztráta kvality obrazu z 3DISCO projasněných vzorků, v důsledku nutnosti jejich umístění do kapiláry (viz obr. 24), brání možnosti rozlišit a později segmentovat fluorescenčně značené struktury jako jádra či membrány (viz obr. 25).

### 5.1.5 KOMPATIBILITA DAPI, HOECHST 33342 A PI ZNAČENÍ S CUBIC

Pro jednotlivé projasňovací techniky byla testována tři jaderná značení, dvě v preferovaném modrém kanále (DAPI a Hoechst 33342) a PI v červeném. Jako kontrola projasnění tkáně (tedy, že detekce či absence signálu není dána neprůhledností tkáně) sloužila fluorescence GFP, díky využití 1mm řezů slezinou z MHCII/EGFP+ myši.



Obr. 26: Snímky (v ose XY) CUBIC projasněných 1mm řezů myší slezinou (MHCII/EGFP+ myši) značených DAPI, Hoechst 33342 či PI v ose XY z hloubky ~50  $\mu\text{m}$  a korespondujících neznačených kontrol. Kontrast u jednotlivých snímků je nastaven různě, za účelem efektivnější vizuální prezentace dat. Absolutní intenzitu signálu ilustrují histogramy pod snímky. Mikroskop Zeiss Z.1 s Clr Plan-Neofluar 20x/1.0. Měřítka 250  $\mu\text{m}$ .

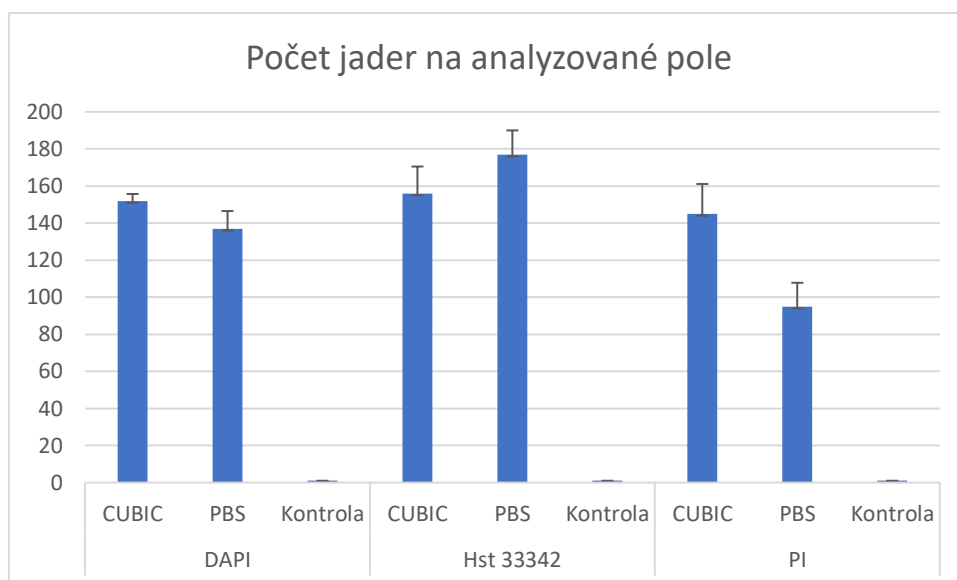


Obr. 27: Snímky membránově lokalizované fluorescence EGFP (v ose XY) v CUBIC projasněných 1mm řezů myší slezinou (MHCII/EGFP+ myši) značených DAPI, Hoechst 33342 či PI v ose XY z hloubky ~50  $\mu\text{m}$  a korespondujících neznačených kontrol. Kontrast u jednotlivých snímků je nastaven různě, za účelem efektivnější vizuální prezentace dat. Absolutní intenzitu signálu ilustrují histogramy pod snímky. Mikroskop Zeiss Z.1, s Clr Plan-Neofluar 20x/1.0. Měřítka 250  $\mu\text{m}$

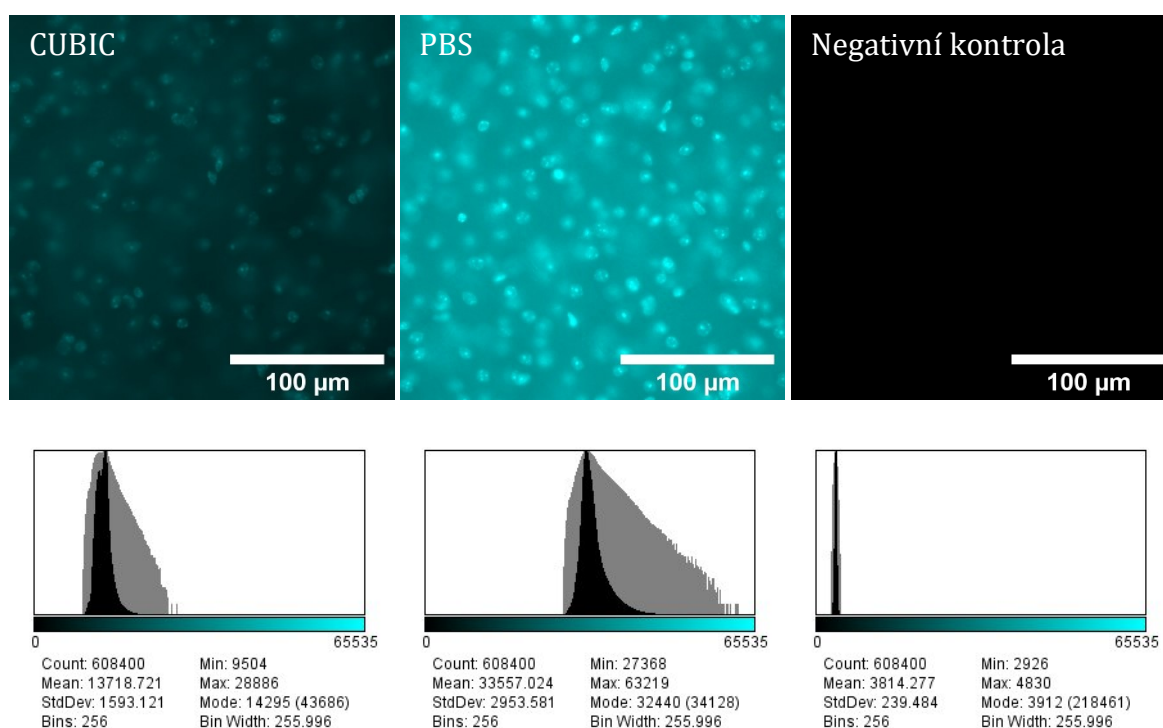
Bylo rozhodnuto pokračovat v projasňování CUBIC protokolem vzhledem k tomu, že poskytoval nejlepší projasnění (viz obr. 18 a 19), nevyžadoval speciální vybavení, bylo reportováno jeho použití na nádorové tkáně a to i v kombinaci se značením protilátkami (Nojima *et al.*, 2017)..

V CUBIC projasněných vzorcích bylo možné detekovat jak jádra značená PI tak DAPI, nikoliv však Hoechst 33342. Vzhledem k tomu že nekompatibilita CUBIC metodiky s Hoechst značením je v rozporu s publikovanými výsledky (Kolesová *et al.*, 2016; McKey *et al.*, 2020), byla kompatibilita s jaderným značením ověřena v separátním experimentu, označením jader v projasněných 250 $\mu\text{m}$  řezech myší mozkovou tkání. Použití mozkové tkáně vzhledem k menší denzitě jader umožňuje jejich rozlišení a segmentaci i na klasickém mikroskopu (bez optického řezání), který je součástí vybavení laboratoře. To umožnilo kvantifikovat jádra v projasněných i neprojasněných vzorcích a ověřit tak, zde Hoechst 33342 umožňuje značení jader v CUBIC projasněných vzorcích obdobně jako PI či DAPI (viz obr. 28).





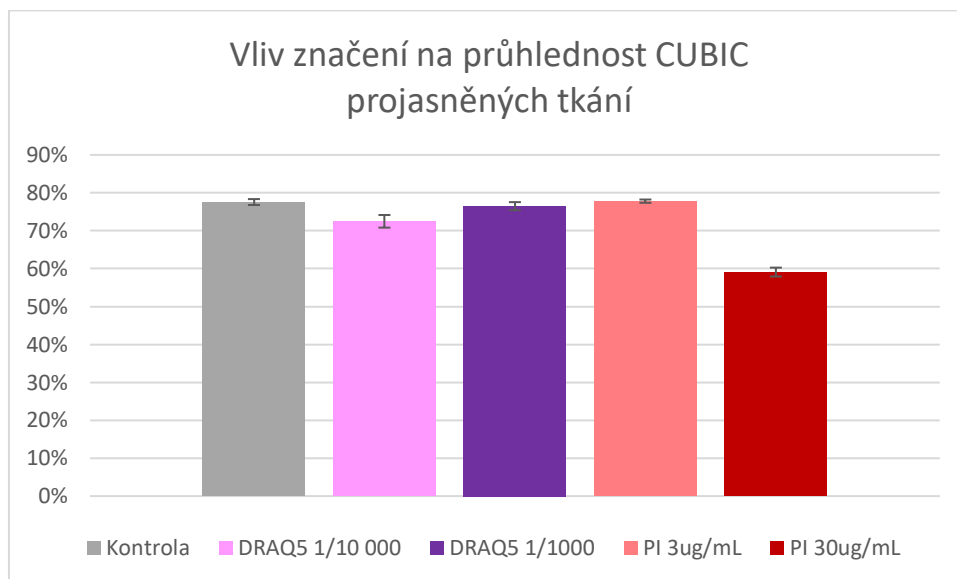
Obr. 28: Počet jader (průměr, chybové úsečky = SD) na analyzované pole v projasněných (CUBIC) neprojasněných (PBS) a nenaznačených (kontrola) 250 $\mu$ m řezech myšími mozky.



Obr. 29: Ilustrativní snímky analyzovaného pole mozkové myší tkáně nabarvené Hoechst 33342 projasněné CUBIC protokolem, neprojasněné a neznačené negativní kontroly. Leica DMi8 s HC FL PLAN 40x/0.65. Měřítka 100  $\mu$ m.

Jak kvantifikace jader (viz obr. 28) tak vizuální inspekce vzorků (viz obr. 29) potvrdily kompatibilitu CUBIC metody se značením jader pomocí Hoechst 33342.

V dalších experimentech jsme využívali jako základní značení buď DAPI či PI. PI je vhodnější díky delší vlnové délce excitace a emise a tím menší náchylnosti k rozptylu signálu v silných vzorcích, na druhou stranu při použití vyšších excitačních intenzit či delších časů může docházet k detekci jeho fluorescence i ve vzdáleném červeném kanále, ve kterém byl snímán signál z protilátek. Z toho důvodu bylo v některých experimentech místo PI využito DAPI (v případě lightsheet mikroskopu je přesvit zanedbatelný díky pozici excitačního a zejména emisního filtru do dostatečně dlouhých vlnových délek).

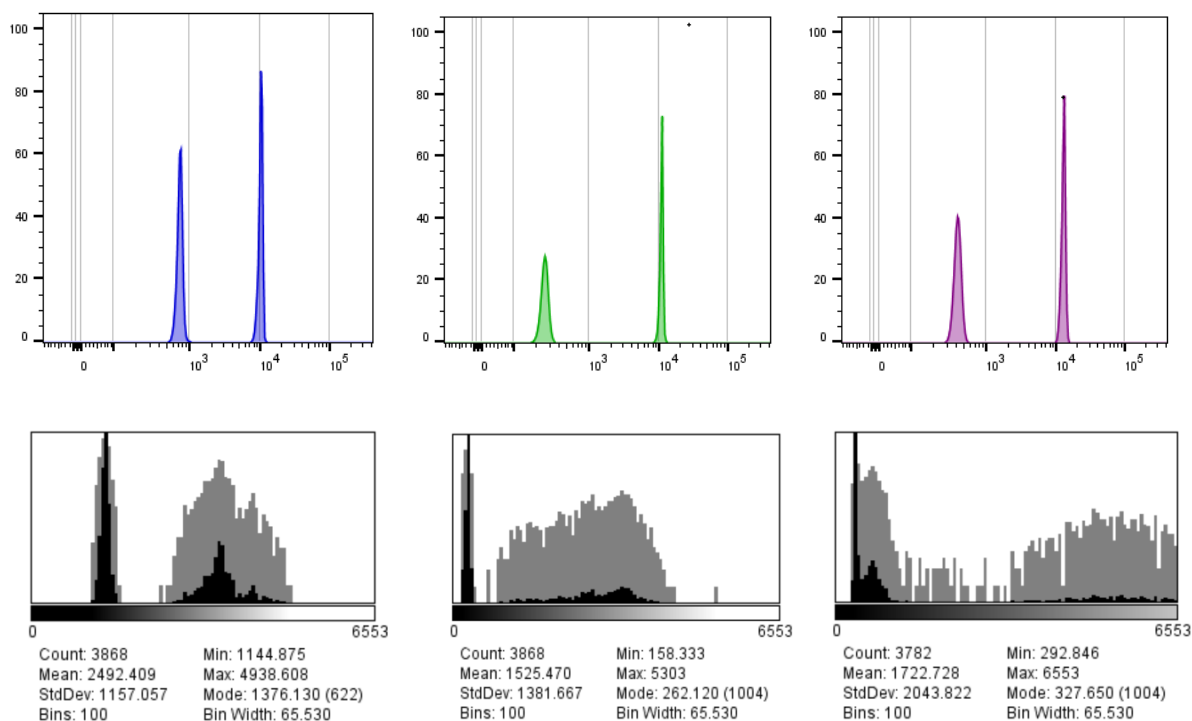


*Obr. 30: Relativní transmitance tkání po označení jader DRAQ5 a PI (N = 3, chybové úsečky = SD). Axizoom V.16 s PlanNeoFluoar Z 2.3/0.5.*

Vzhledem k absorpci PI a DRAQ5 ve viditelném spektru, která způsobuje menší průhlednost tkání byl ověřen vliv značení těmito molekulami na relativní transmitanci CUBIC projasněné tkáně (viz obr. 23). Transmitance jak neznačené kontroly, tak tkání nabarvených DRAQ5 či PI (v koncentraci 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) se pohybovala mezi 70 – 80 %, značení PI v koncentraci 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  vedlo k jejímu poklesu pod 60 %.

## 5.2 KORELACE DAT Z PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE A MIKROSKOPIE

Pro přímé a rychlé porovnání dat z průtokové cytometrie a mikroskopie jsme vytvořily makro v programu ImageJ (viz příloha 4), umožňující segmentaci, kvantifikaci intenzity fluorescence pro segmentované částice a následné vynesení těchto hodnot do histogramu přímo v programu ImageJ.



V1 (modrý kanál)

B1 (zelený kanál)

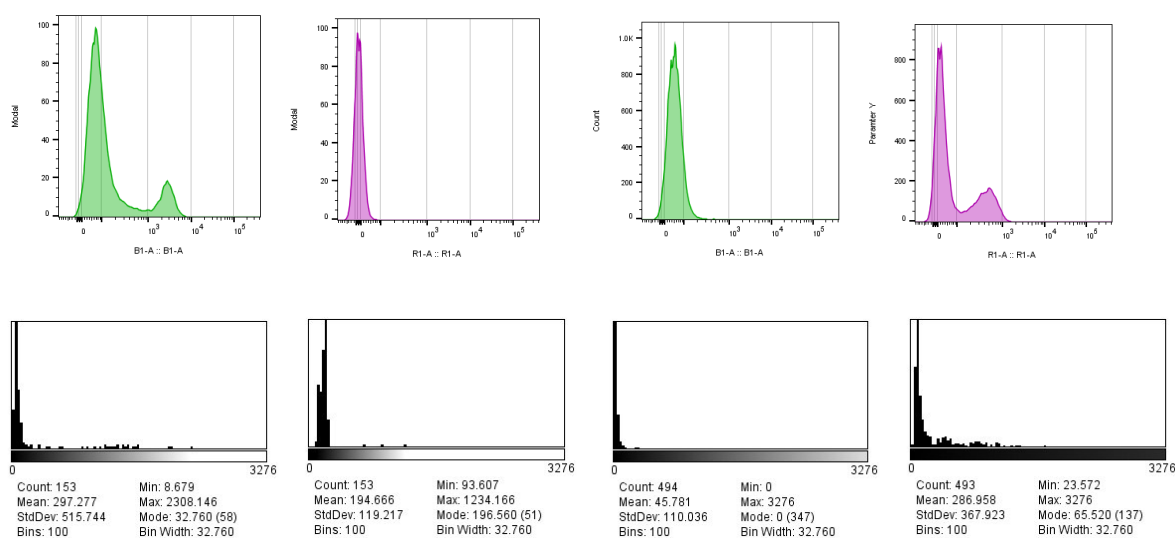
R1 (vzdálený červený kanál)

Obr. 31: příklad analýzy mikroskopických dat s vizuálním výstupem v podobě histogramu průměrných intenzit fluorescence jednotlivých částic (spodní řádek) a porovnání s výstupem z průtokové cytometrie (horní řádek) na kalibračních fluorescenčních kuličkách dvou intenzit v modrém, zeleném a červeném kanále. Ačkoliv je výrazný vizuální rozdíl mezi zobrazeními (důvodem je zejména biexponenciální škála v rozsahu 0 – 400 000 v případě cytometrických a lineární škála v rozsahu 0 – 6553 v případě mikroskopických dat), obě umožňují odlišení dvou separátních populací objektů na základě intenzity fluorescence.

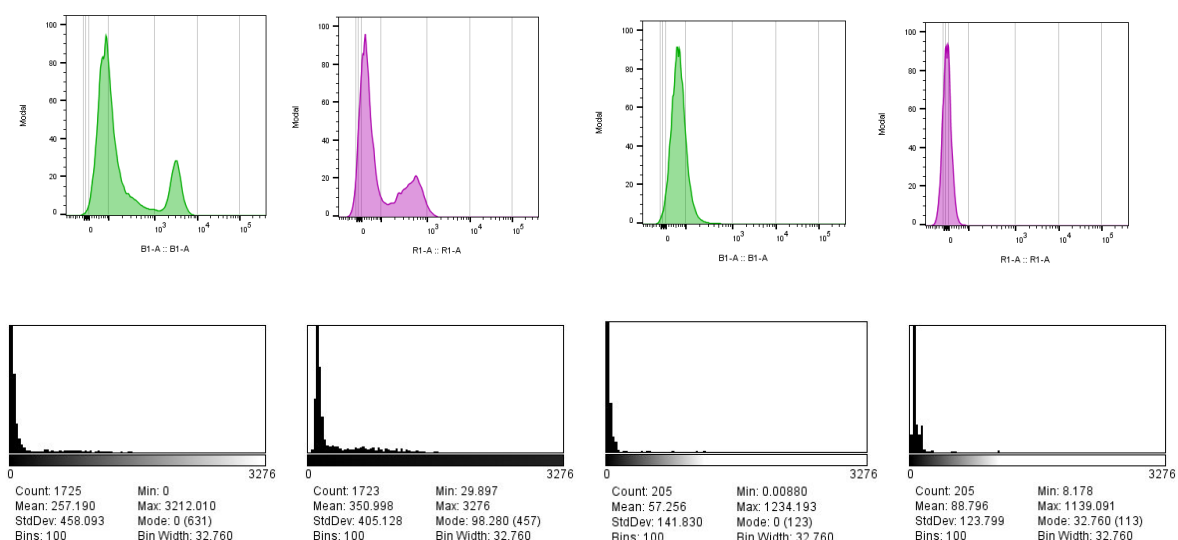
Alternativně by bylo možné namísto průměrné intenzity fluorescence kvantifikovat pro danou segmentovanou částici sumu intenzit jednotlivých pixelů (v originále “integrated density”). Takový výstup by pak v absolutních hodnotách více odpovídal datům z cytometrie (kde je hodnota pro danou měřenou částici funkcí intenzity fluorescence a velikosti částice), nevýhodou však je omezená vypovídající hodnota ve vztahu k segmentaci částic. Intenzita signálu je v případě kvantifikace objektů v mikroskopii kritická pro úspěšnou segmentaci obrazu s využitím

prahování. Tento proces je závislý na rozdílu intenzity jednotlivých pixelů tvořících částici, která má být segmentována, a pixelů tvořících pozadí. Relevantnějším ukazatelem v případě této práce je tedy informace vztažená vůči jednomu pixelu (průměrná intenzita fluorescence), nikoliv vůči celé částici. Situace, kdy by bylo vhodnější použít sumu intenzit, by byla například kvantifikace exprese konkrétního proteinu v již nasegmentovaných částicích – buňkách.

Pro demonstraci korelace dat mezi průtokovou cytometrií a mikroskopií na biologickém materiálu byla analyzována suspenze splenocytů značená buďto jednou (obr. 32) či oběma (obr. 33) námi konjugovanými protilátkami (anti-CD4 konjugovanou s Alexa Fluor 488 či anti-TCR-beta konjugovanou s Janelia Fluor 647). Vizuální porovnání dat získaných oběma metodami umožňují histogramy vytvořené v programech FLOWJo (pro data z cytometrie) či FIJI (pro data z mikroskopie).



*Obr. 32: detekce CD4+ a TCR-beta+ buněk v suspenzi myších splenocytů pomocí průtokové cytometrie (horní řádek) a mikroskopie (spodní řádek) ve vzorcích značených anti-CD4 protilátkou konjugovanou s Alexa Fluor 488 (vlevo) nebo anti-TCR-beta protilátkou konjugovanou s Janelia Fluor 646 (vpravo). Barevné podání odráží použitý kanál – zelený pro Alexa Fluor 488, červený pro Janelia Fluor 646.*



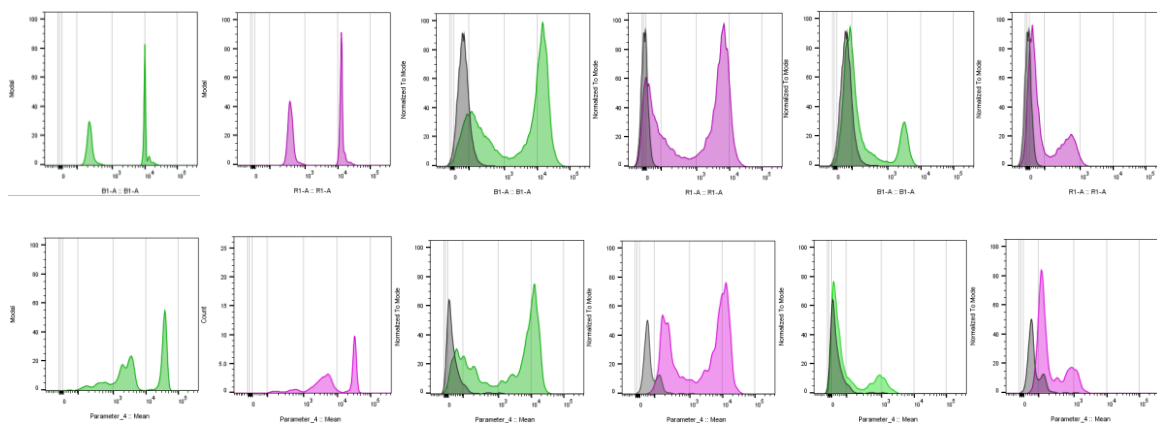
Obr. 33: detekce CD4+ a TCR-beta buněk v suspenzi myších splenocytů pomocí průtokové cytometrie (horní řádek) a mikroskopie (spodní řádek) ve vzorcích značených anti-CD4 protilátkou konjugovanou s Alexa Fluor 488 a anti-TCR-beta protilátkou konjugovanou s Janelia Fluor 646 (vlevo) či v neznačené kontrole (vpravo). Barevné podání odráží použitý kanál – zelený pro Alexa Fluor 488, červený pro Janelia Fluor 646.

Pro kvantitativní porovnání obou metod byly analyzovány relativní počty (% ze všech buněk) TCR-beta+ a CD4+ buněk na základě cytometrických a mikroskopických dat (viz tab. 2). Mezi výsledky obou metod nebyl signifikantní rozdíl.

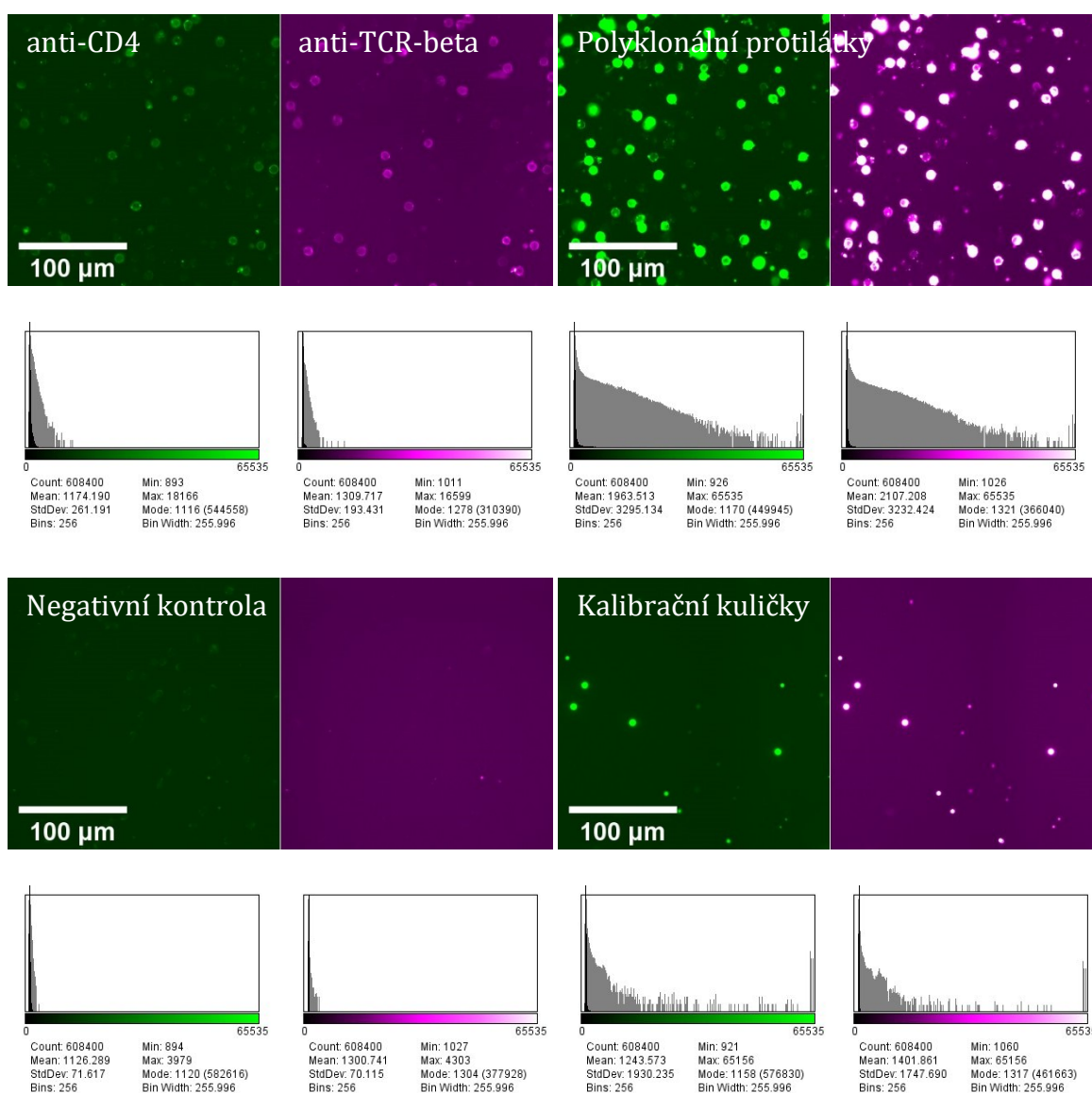
Populace buněk	Očekávané zastoupení	Zastoupení na základě cytometrie (SD)	Zastoupení na základě mikroskopie (SD)
TCR-beta+	30 – 35 %	29.4 (0.34) %	25.9 (1.64) %
CD4+	20 – 25 %	16.4 (1.4) %	20.6 (0.96) %

Tab. 2: kvantifikace TCR-beta+ a CD4+ subpopulací T lymfocytů v suspenzi myších splenocytů pomocí průtokové cytometrie a mikroskopie. V zastoupení jednotlivých populací nebyl signifikantní rozdíl mezi měřením pomocí mikroskopie a průtokové cytometrie (párový T test,  $n = 3$ ,  $p = 0.13$  pro TCR-beta a  $p = 0.11$  pro CD4)

Data zahrnující průměrnou intenzitu fluorescence na jednu buňku, na jejichž základě jsou vytvořeny histogramy představující výstup z obrazové analýzy v SW ImageJ, lze navíc exportovat jako .csv soubory. Ty je možné otevřít ve FlowJo SW a analyzovat tak pozitivní/negativní populace buněk na základě intenzity fluorescence obdobně jako v případě cytometrie (viz obr. 34).



Obr. 34: Porovnání výstupů analýzy kalibračních kuliček (vlevo), buněk barvených polyklonálními protilátkami (uprostřed) a buněk barvených anti-CD4 a anti-TCR-beta protilátkou (vpravo) pomocí průtokové cytometrie (nahore) a pomocí fluorescenční mikroskopie a následně segmentace (dole).

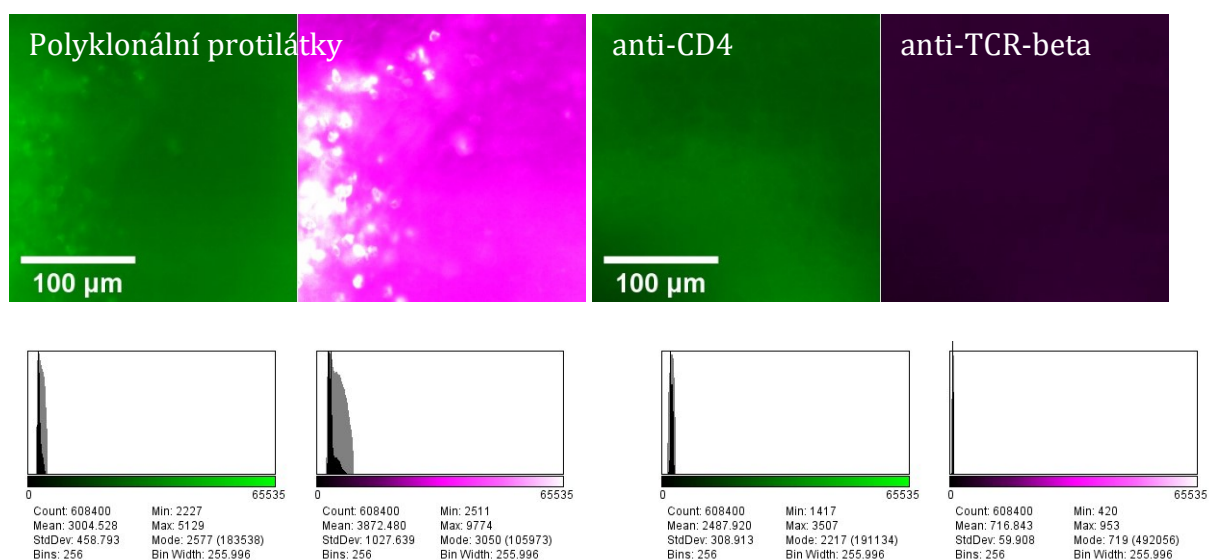


*Obr. 35: Ilustrativní mikroskopické snímky splenocytů analyzovaných pomocí průtokové cytometrie a mikroskopie. Nahoře buňky nabarvené námi značenými protilátkami proti TCR-beta v červeném a CD4 v zeleném kanále (vlevo) či nabarvené polyklonálními protilátkami v červeném a zeleném kanále sloužící jako pozitivní kontrola (vpravo). Dole pak negativní kontrola (vlevo) a kalibrační kuličky (vpravo), nasnímané na stejné nastavení a prezentované ve stejných škálách. Leica DMi8 s HC FL PLAN 40x/0.65.*

Jak data z průtokové cytometrie (viz obr. 34) tak z mikroskopie (viz obr. 35) ilustrují řádově slabší intenzitu signálu z námi konjugovaných anti-CD4 a anti-TCR-beta protilátek v porovnání s polyklonálními protilátkami. Tento rozdíl v intenzitě byl klíčový pro detekci či absenci signálu v projasněných tkáních (viz obr. 36)

### 5.3 DETEKCE CD4+ A TCR-BETA+ BUNĚK V PROJASNĚNÉ TKÁNI S VYUŽITÍM BĚŽNÉ MIKROSKOPIE

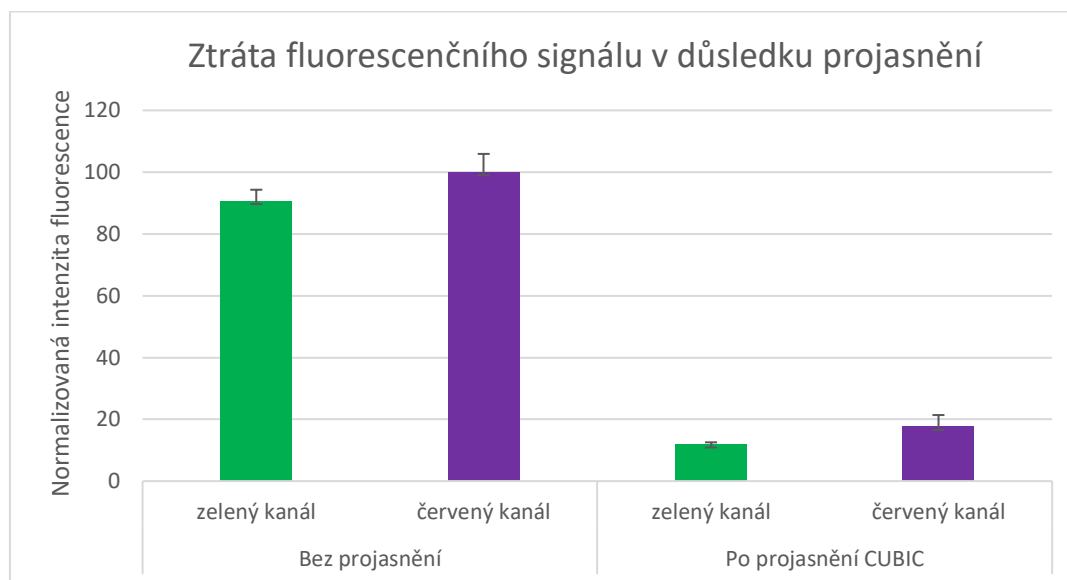
Kvantitativní porovnání intenzit fluorescence nabarvených suspenzí splenocytů pomocí dvou nezávislých metod (průtoková cytometrie, mikroskopie) nám posloužilo pro identifikaci důvodů absence signálu z protilátek CD4 a TCR-beta v projasněných tkáních v kontrastu s přítomností signálu z polyklonálních myších protilátek, které nám sloužily jako pozitivní kontrola.



*Obr. 36: Ilustrační obrázky z 250µm CUBIC projasněných řezů myší slezinou značených polyklonálními protilátkami a z řezů značených námi konjugovanými protilátkami. Leica DMi8 s HC FL PLAN 40x/0.65.*

Zatímco v projasněných vzorcích značených polyklonálními protilátkami bylo možné detekovat pozitivní buňky (viz obr. 36 a 39), v případě námi konjugovaných protilátek tomu tak nebylo (viz obr. 36 a 38). Protože ke ztrátě fluorescenčního signálu může přispívat samotné projasňování, byl v dalším experimentu kvantifikován pokles fluorescence v důsledku projasňování. Byly k tomu

využity polyklonální protilátky, vzhledem k tomu, že signál z námi značených se nepodařilo detekovat.



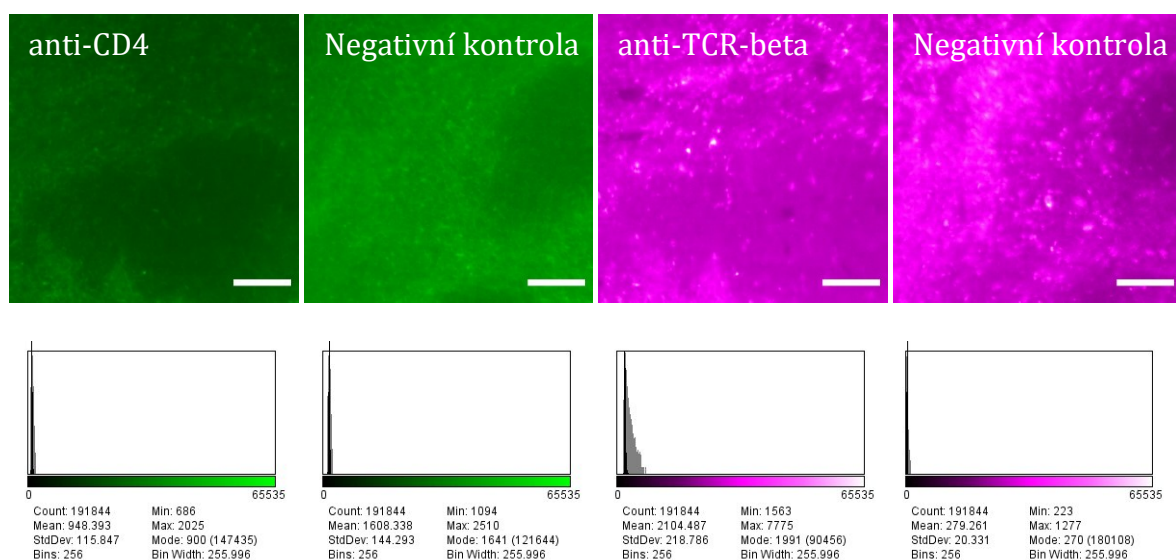
*Obr. 37: Ztráta fluorescenčního signálu v důsledku projasňování CUBIC protokolem v 250 $\mu$ m řezech myší slezinou značených polyklonálními protilátkami proti myším IgG konjugovanými s Alexa Fluor 488 a Alexa Fluor 647 (N = 3, chybové úsečky = SD).*

Kvantifikace fluorescence před a po projasnění ukázala výrazný pokles fluorescenčního signálu z protilátek (z 91 % na 12 % v zeleném kanále a ze 100 % na 18 % ve vzdáleném červeném kanále).

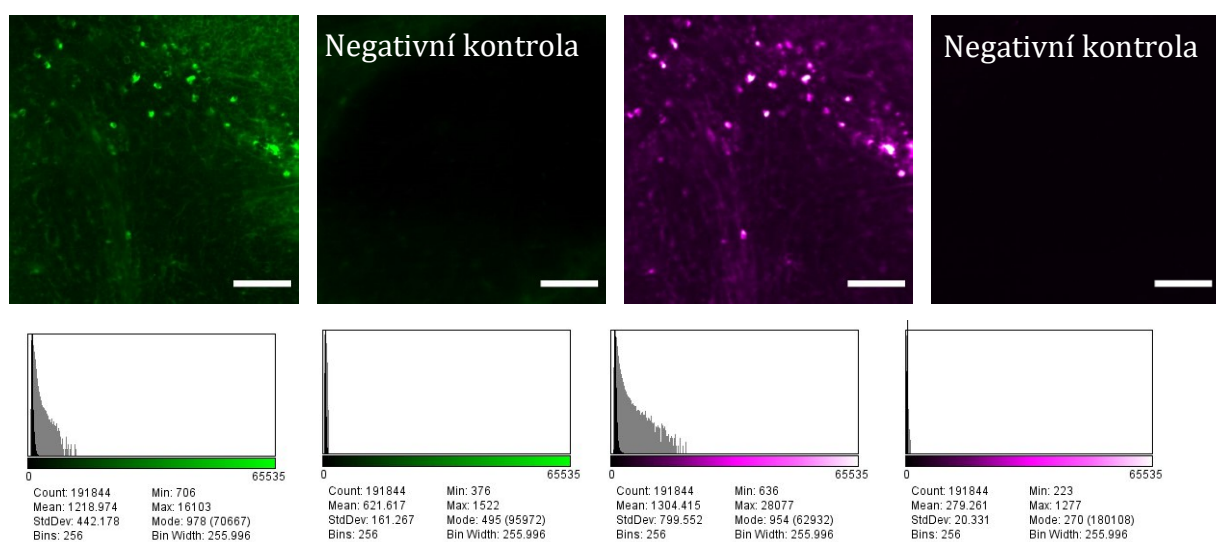
## 5.4 DETEKCE CD4+ A TCR-BETA+ BUNĚK V PROJASNĚNÉ TKÁNI S VYUŽITÍM LIGHTSHEET MIKROSKOPIE

Detekce signálu v projasněných tkáních při zobrazování pomocí klasické mikroskopie je omezená signálem z částí vzorků nacházejících se mimo rovinu ostrosti. Pro ověření toho, zda tento efekt nestojí za absencí signálu z anti-CD4 a anti-TCR-beta byly označeny protilátkami a projasněny 1mm řezy myší slezinou a zobrazeny na Zeiss Z.1 lightsheet mikroskopu.





Obr. 38: Absence pozitivního signálu z 1mm řezů slezinou myší projasněných CUBIC a značených anti-CD4 a anti TCR-beta protilátkami, konjugovanými s Alexa Fluor 488 či Janelia Fluor 647 a korespondujících negativních kontrol. Mikroskop Zeiss Z.1 s Clr Plan-Neofluar 20x/1.0. Měřítka 100  $\mu$ m.



Obr. 39: Signál z 1mm řezů myší (v ose XY) slezinou projasněných CUBIC a značených polyklonálními protilátkami a korespondujících negativních kontrol. Mikroskop Zeiss Z.1 s Clr Plan-Neofluar 20x/1.0. Měřítka 100  $\mu$ m.

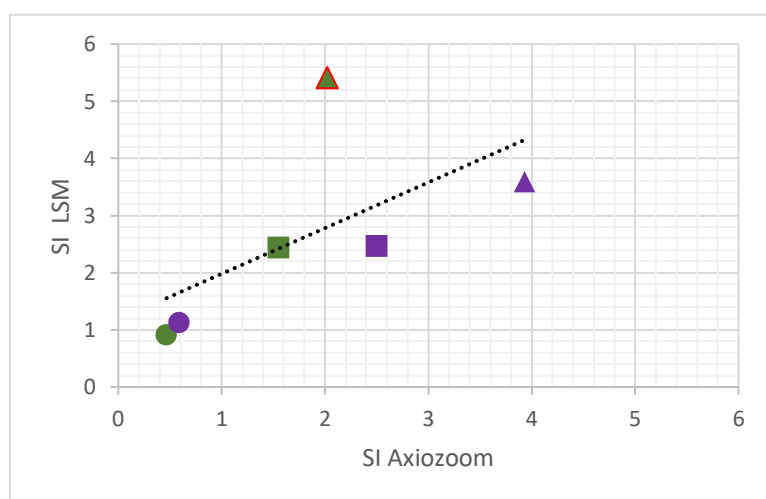
Vzhledem k tomu že signál z polyklonálních protilátek je násobně silnější než signál z námi konjugovaných protilátek, byly pro snímání vzorků označených námi konjugovanými protilátkami a korespondující kontroly použity vyšší intenzity iluminace a delší expoziční časy (při kterých by signál z polyklonálních protilátek byl mimo dynamický rozsah detektoru), aby byla vyloučena absence signálu v důsledku nevhodně nastavených akvizčních parametrů. Přesto se

nám nepodařilo detekovat signál z TCR-beta ani CD4 pozitivních buněk (viz obr. 38). Zpětně byla ověřena správnost akvizičních parametrů nasnímáním kalibračních kuliček (ačkoliv z důvodů popsaných výše není možné korelovat přímo data z kuliček s intenzitou fluorescence buněk, pro orientační ověření expozičních parametrů lze tento postup využít). Zvolené akviziční parametry umožňovaly detekci středně jasných kuliček, jejichž intenzita přibližně odpovídá intenzitě TCR-beta či CD4 značených splenocytů (viz obr. 34). To podporuje hypotézu, že signál nebylo možné detekovat z důvodu nekompatibility námi značených protilátek s detekcí v projasněných vzorcích.

## 5.5 POUŽITÍ ALTERNATIVNÍCH METOD ZOBRAZOVÁNÍ PRO PŘÍPRAVU VZORKŮ PRO LIGHTSHEET MIKROSKOPII

Cílem bylo optimalizovat v co největší možné míře přípravu vzorku na mikroskopech v laboratoři (a s využitím ApoTome systému) pro eliminaci časové a finančně náročného zobrazování vzorků na Lightsheet mikroskopu. To zahrnuje: ověření, zda je tkáň dostatečně projasněná (umožňuje detekci signálu v celém objemu, v našem případě do hloubky 1 mm) a zda je homogenně probarvená protilátkami.

První otázkou bylo, zda samotná kvalita signálu koreluje mezi lightsheet mikroskopií a detekcí na Axiozoomu s ApoTome. Pro kvantifikaci kvality signálu byl využit tzv. stain index, parametr běžně používaný v cytometrii, který odráží kvalitu signálu jakožto podíl rozdílu intenzity signálu a intenzity pozadí a dvojnásobku směrodatné odchylky pozadí. Byly využity polyklonální protilátky proti myším IgG, a jako model posloužily tři různé tkáně (mozek, slezina a myší nádorová tkáň) mimikující možnou heterogenitu případných vzorků.

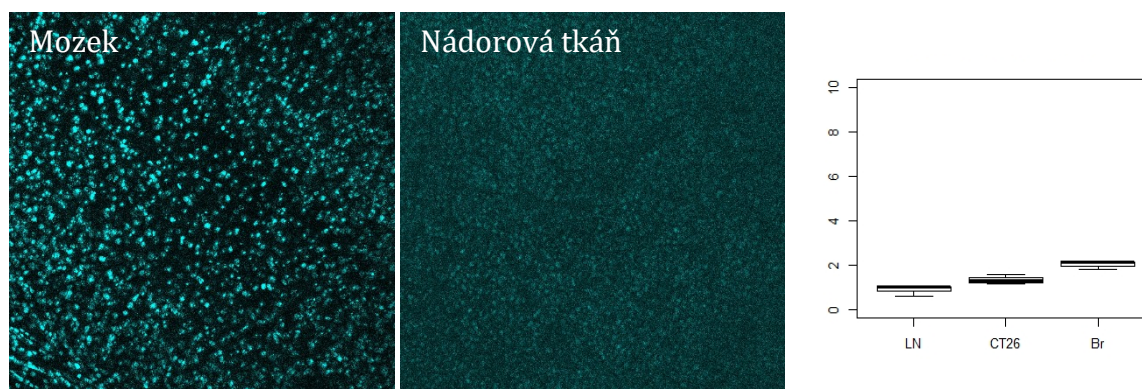


Obr. 40: Korelace kvality signálu kvantifikované SI mezi snímky získanými na Lightsheet mikroskopu a na Axiozoomu. Byly použity tři druhy tkání (MHCII-EGFP slezina – trojúhelníky, nádorová tkáň – body, mozková tkáň – čtverce) značené polyklonálními protilátkami (anti-IgG AlexFluor 488 - zelená a

anti-IgG AlexFluor 647 fialová) a snímáné v zeleném a červeném kanále.

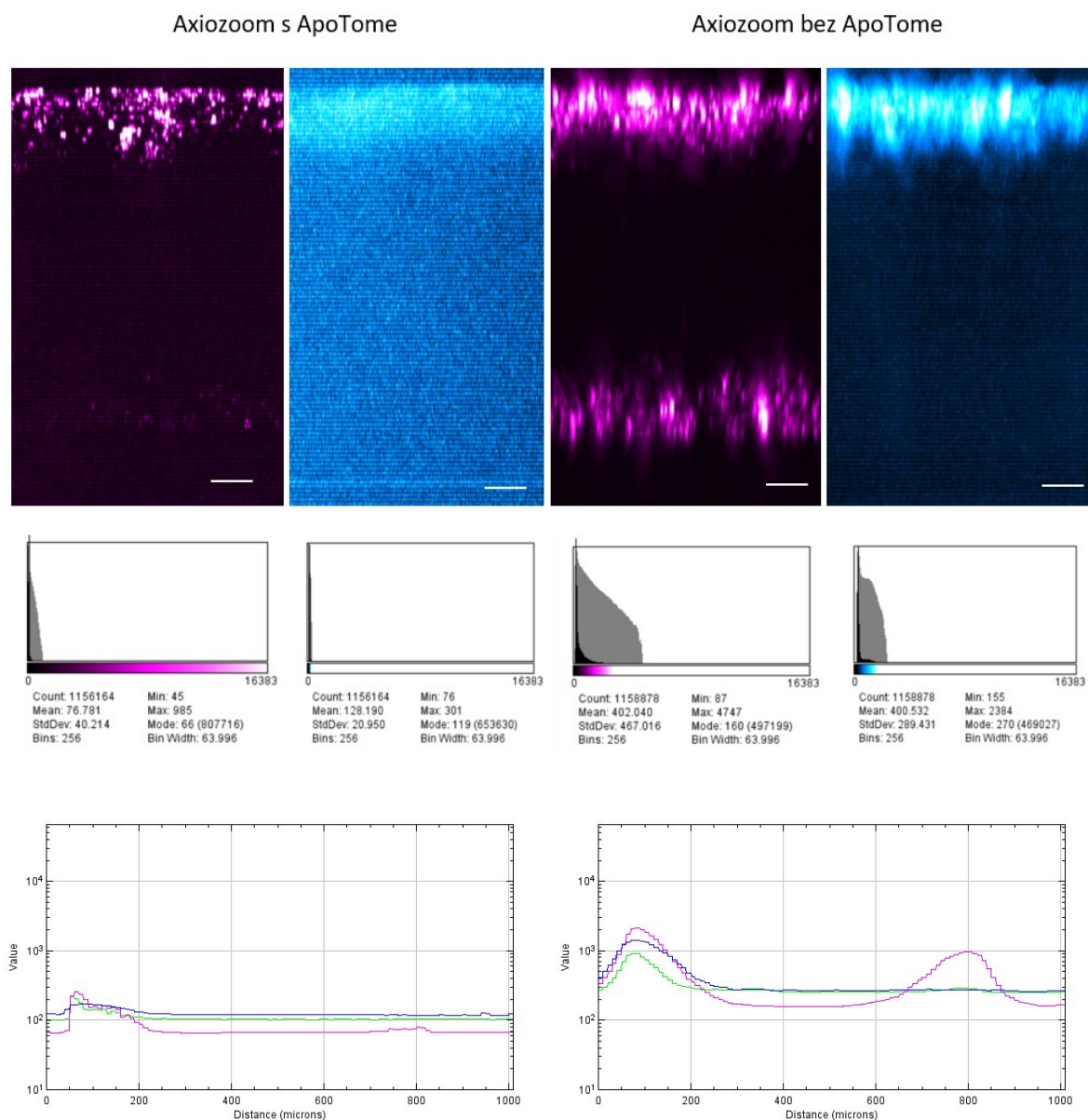
Jak ilustruje obr. 40 kvalita signálu z Axizoomu a lightsheet mikroskopu koreluje (korelační koeficient  $p = 0,62$ ). Výrazně se lišila kvalita signálu pouze v jednom případě, a to u detekce fluorescence v zeleném kanálu v případě sleziny, která sloužila jako modelový případ tkáně s vysokým pozadím (v tomto případě tvořeným fluorescencí EGFP).

Ideální pro validaci projasnění tkáně je využití malých fluorescenčních značek jako PI či DAPI, které dobře difundují do tkáně a detekce či nepřítomnost signálu skrz celý objem tkáně tak odráží míru projasnění a není ovlivněna nedostatečnou difuzí fluorescenčního barviva (jak tomu může být v případě protilátek). Problém však představuje efekt, kdy vysoká hustota značených struktur (v tomto případě jader) mimo rovinu ostrosti způsobuje zvýšení pozadí a v případě použití wide-field systému i ztrátu signálu z roviny ostrosti. To ilustruje detekce jader na povrchu tří různých tkání lišících se hustotou jader (viz obr. 41).



Obr. 41: ilustrativní snímek jader v 250 $\mu$ m řezu myší mozkovou tkání a nádorovou tkání (vpravo) a rozdílů v kvalitě signálu kvantifikované stain indexem (krabicový graf vpravo) u stejně značených a nasnímaných tkání, pouze na základě rozdílné abundance detekované struktury. Axizoom s ApoTome s PlanNeofluoar Z 1x/0.25

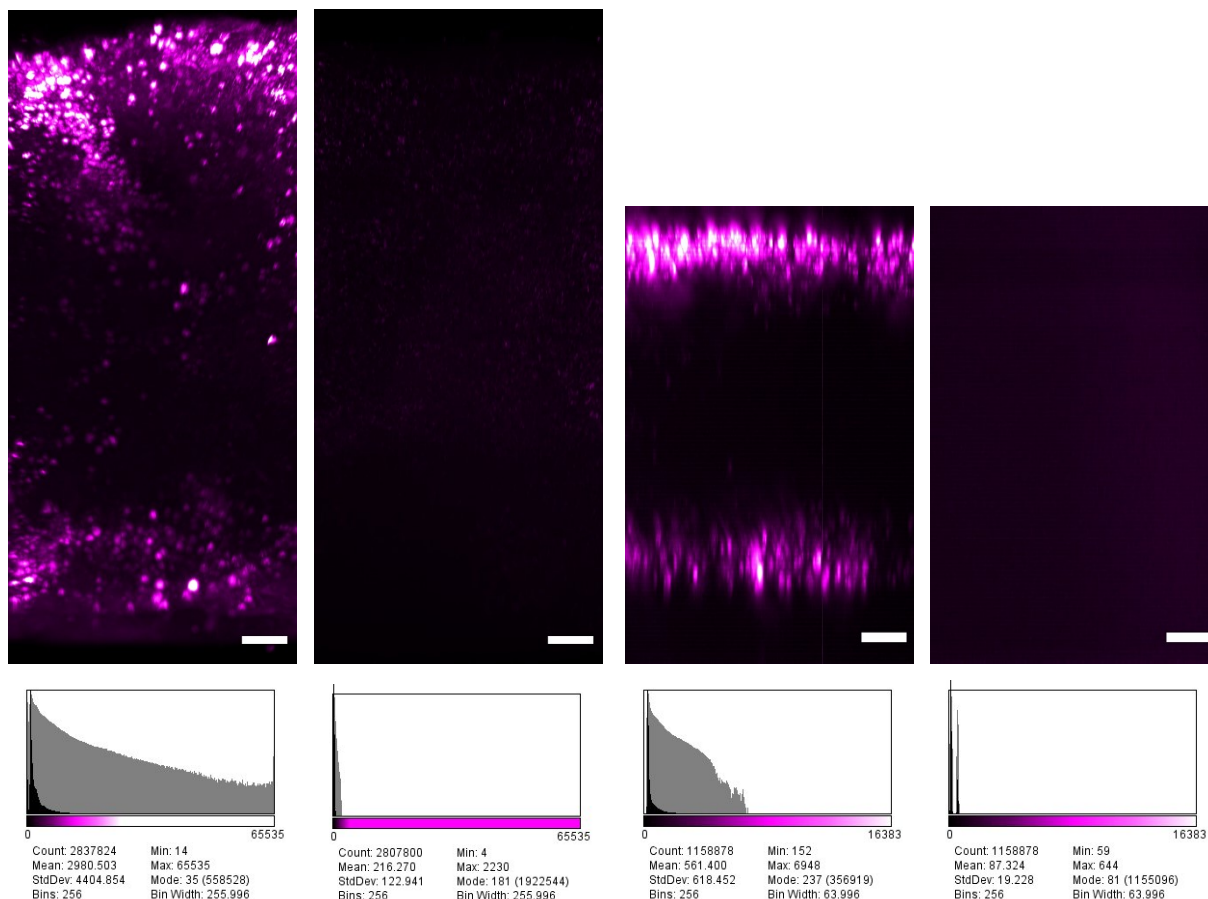
Kvantifikací kvality jaderného signálu detekovaného pomocí Axizoom s ApoTome bylo potvrzeno, že mezi tkáněmi je signifikantní rozdíl (ANOVA,  $p = 0.002$ ,  $n = 9$ ) v kvalitě jaderného signálu, jehož ztráta je dána vysokou denzitou jader, která způsobuje emisi velkého množství signálů z nezaostřených rovin a tím ztrátu specifického signálu z roviny ostrosti.



Obr. 42: Porovnání signálu z 1mm řezů myší slezinou (v ose ZY) značených polyklonálními protilátkami (červeně) a DAPI (modře), získaného pomocí optického řezání s využitím ApoTome a snímku bez využití optického řezání s odstraněním pozadí pomocí ImageJ. Dole korespondující kvantifikace průměrné fluorescence v závislosti na hloubce. Měřítko 100  $\mu\text{m}$ . Axiozoom s PlanNeofluoar Z 1x/0.25.

Vzhledem ke zmíněnému efektu arteficiální ztráty signálu bylo dále otestováno, zda absence signálu z protilátek v centru vzorku patrná při snímání na mikroskopu Zeiss Axiozoom, odpovídá skutečné absenci signálu při snímání na lightsheet mikroskopu.





Obr. 43: Snímek 1mm řezu myší slezinou značenou polyklonální protilátkou, snímaného na lightsheet mikroskopu Zeiss Z.1a na mikroskopu Axiozoom. Projekce maximální intenzity v ose YZ. Měřítka 100  $\mu\text{m}$ . Zdánlivý rozdíl ve velikosti vzorku je dán deformací signálu v případě zobrazování na mikroskopu Axiozoom z důvodu umístění vzorku do média s vyšším indexem lomu ( $RI = 1.47$ ), než na který je korigován objektiv ( $RI = 1.0$ ). Měřítka 100  $\mu\text{m}$ . Axiozoom s ApoTome s PlanNeofluoar Z 1x/0.25. Mikroskop Zeiss Z.1 s Clr Plan-Neofluar 20x/1.0

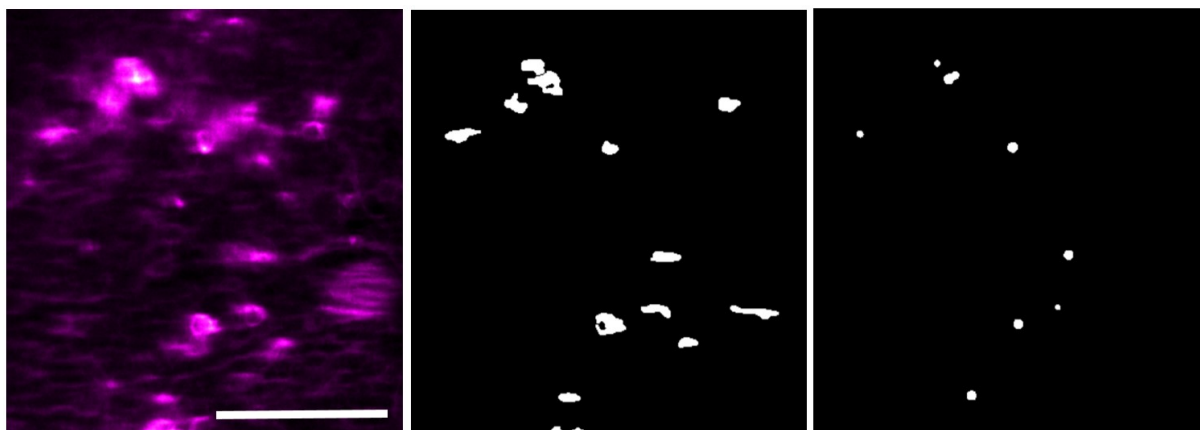
Zatímco v případě lightsheet mikroskopie je signál zřetelný skrz celý objem vzorku (ačkoliv je zřetelný gradient v důsledku nedostatečné penetrace protilátky), při zobrazování na Axiozoom je signál viditelný pouze na površích vzorku (viz obr. 43).

## 5.6 SEGMENTACE A KVANTIFIKACE BUNĚK VE 3D

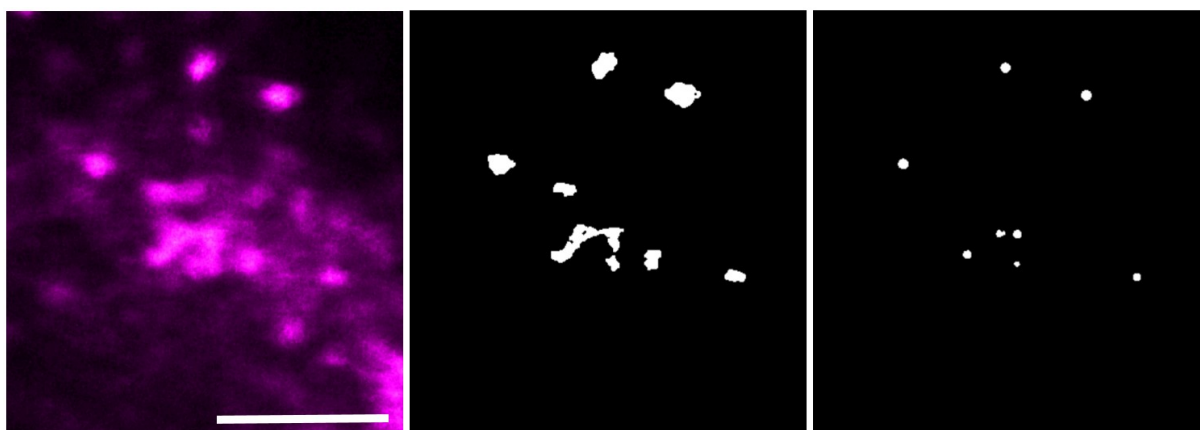
Ačkoliv v důsledku nekompatibility protilátek nebylo možné detekovat ani analyzovat původně zamýšlené lymfocytární populace (CD4+ a TCR-beta+ lymfocyty), bylo využito pozitivních kontrol značených polyklonálními protilátkami k demonstraci analýzy tkáně ve 3D.

Ta sestávala z tří klíčových kroků: dekonvoluce dat v program Huygens, segmentace oblastí na základě signálu z membrán buněk označených protilátkou v ImageJ a následná detekce jednotlivých buněk v programu Imaris (viz metody).

Hloubka  $\sim 100\ \mu\text{m}$

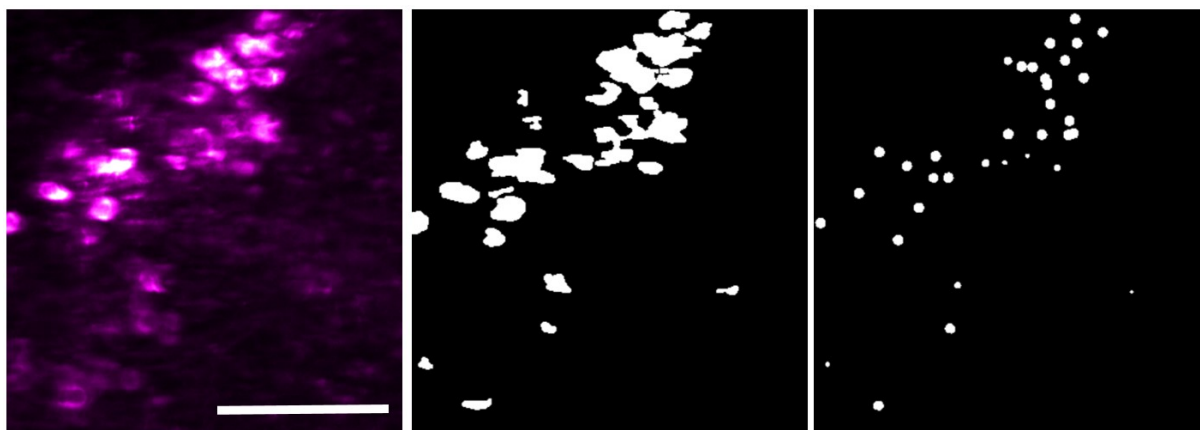


Hloubka  $\sim 900\ \mu\text{m}$



*Obr. 44: snímky ilustrující signál v původním dekonvolvaném obraze (v ose XY) z lightsheet mikroskopu (vlevo), vytvořená binární maska na základě oblastí s vysokou intenzitou signálu a 3D segmentace v ImageJ (uprostřed), jednotlivé body reprezentující detekované buňky s využitím nástrojů v program Imaris. Měřítko  $100\ \mu\text{m}$ . Mikroskop Zeiss Z.1 s Clr Plan-Neofluar 20x/1.0.*

Náhled v ose XY



Náhled v ose XZ



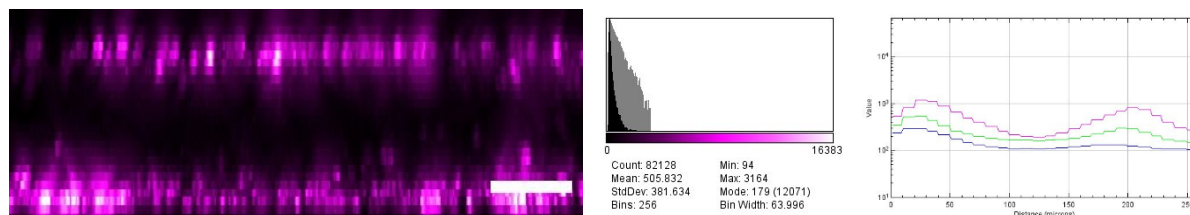
Obr. 45: snímky ilustrující signál v původním dekonvolvaném obraze (v ose ZY) z lightsheet mikroskopu (vlevo), vytvořená binární maska na základě oblastí s vysokou intenzitou signálu a 3D segmentace v ImageJ (uprostřed), jednotlivé body reprezentující detekované buňky s využitím nástrojů v program Imaris. Měřítka 100  $\mu\text{m}$ . Mikroskop Zeiss Z.1 s Clr Plan-Neofluar 20x/1.0.

## 5.7 OPTIMALIZACE CUBIC PROTOKOLU PRO BARVENÍ PROTILÁTKAMI

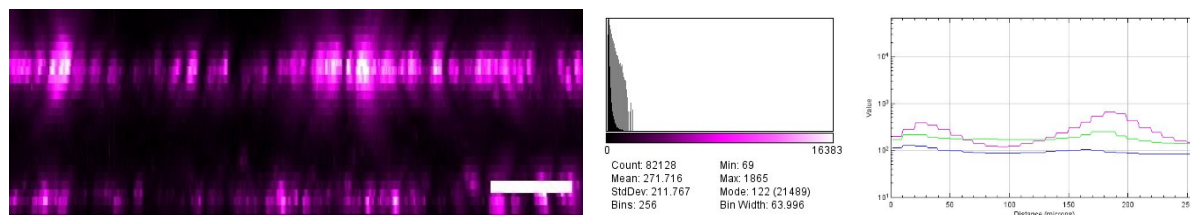
Pro experimenty, při nichž jsme vyhodnocovali schopnost jednotlivých metodik projasnit vzorky a poskytnout kvalitní signál jsme využili tkáň z MHC-II EGFP myši, značené malými fluorescenčními molekulami. Naším ultimátním cílem však bylo značení tkání protilátkami, které samo o sobě v případě objemných vzorků představuje krok vyžadující optimalizaci kvůli ztížené penetraci protilátek do vzorku.(Chen *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2016; Lee and Sun, 2016; Noë *et al.*, 2018). Vzhledem k tomu že detekce signálu z námi naznačených protilátek nebyla úspěšná, byly k tomuto účelu využity polyklonální protilátky proti myším epitopům. Jejich výhodou je i silný signál v poměru k pozadí (viz dále), který umožňuje snazší snímání vzorků a vyhodnocení dat na mikroskopech, které jsou součástí vybavení laboratoře. V kombinaci s využitím řezů tkáněmi o tloušťce 250 $\mu\text{m}$ , díky kterým je možné použít kratší inkubační časy a menší objemy reagentů, jsme tak mohli otestovat vliv různých modifikací protokolů pro značení protilátkami s menšími náklady a v kratším čase než při použití 1mm řezů.

Za účelem rychlého semikvantitativního vyhodnocení penetrace protilátek do vzorku byl vytvořen skript v programu ImageJ, jehož výstupem je graf intenzity fluorescence v ose Z pro všechny kanály (viz makro v příloze 5).

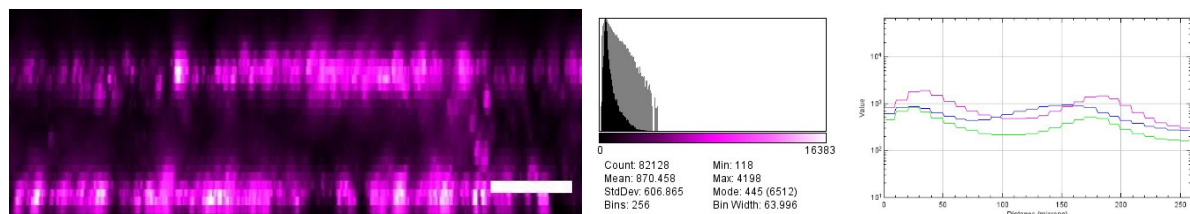
#### Standartní protokol



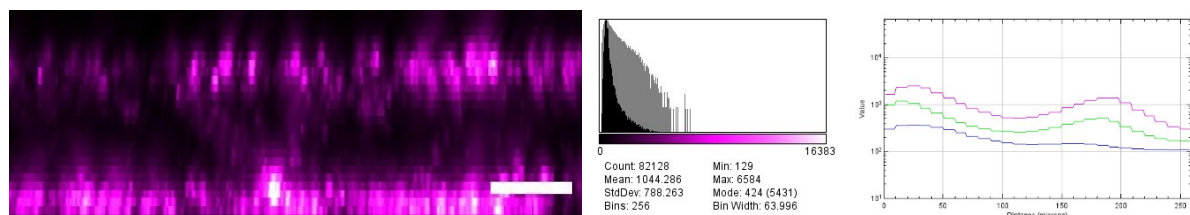
#### Centrifugace



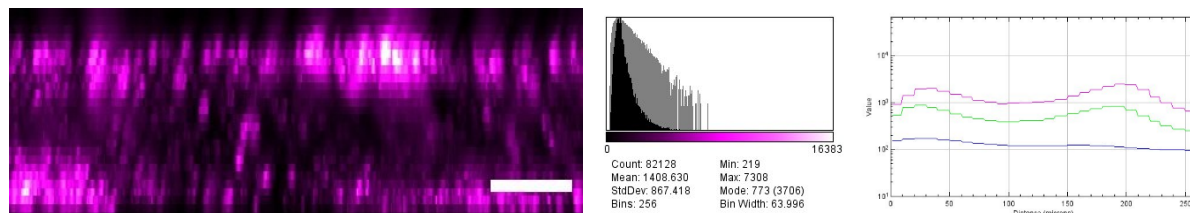
#### Trojnásobná koncentrace protilátek



#### Trojnásobná délka inkubace



#### Kombinace jak trojnásobné koncentrace a trojnásobné délky inkubace



Obr. 46: Modifikace protokolu pro barvení protilátkami testována na 250  $\mu\text{m}$  silných řezech myší slezinou. Vlevo snímky (v ose ZY) projasněnou a nabarvenou tkání v červeném kanále (polyklonální protilátka s Alexa fluor 647), vlevo kvantifikace průměrné intenzity fluorescence v ose Z (v logaritmické škále 0 – 16535 odpovídající celému dynamickému rozsahu detektoru). Axizoom s PlanNeofluoar Z 1x/0.25. Měřítka 100  $\mu\text{m}$ .



## 6 DISKUZE

Cílem této diplomové práce bylo demonstrovat použití dvou nových metodických přístupů – projasňování tkání a lightsheet mikroskopie – k 3D histologii za účelem zhodnocení vlivu heterogenity lokalizace TIL v prostoru na jejich kvantifikaci s využitím 2D histologie. Právě na kvantifikaci CD3+ a CD8+ lymfocytů v invazním okraji a centru nádoru na histologických řezech je založená Imunoskóre diagnostika (Pagès *et al.*, 2018), dnes komercializovaná a schválená pro využití v klinice pro zpřesnění diagnózy pacientů s CrCa (Angell, *et al.* 2020).

Otevřenou otázkou, k jejímuž řešení přispějí poznatky získané v rámci této práce, zůstává heterogenita v lokalizaci imunitních buněk v nádoru. Většina metod používaných běžně v patologii vychází při hodnocení nádoru či nádorového mikroprostředí pouze z 2D informace na základě tenkých (několik  $\mu\text{m}$ ) histologických řezů (Uhlén and Tanaka, 2018). Přitom existuje velké množství evidence zpochybňující reprezentativnost hodnocení inherentně trojrozměrné informace, jakou je rozmístění buněk v nádoru či jejich vzájemná poloha, z omezeného množství náhodně vybrané tkáně či z 2D řezů (Angelova *et al.*, 2018; Besusparis *et al.*, 2016; Bronsert *et al.*, 2014; Glaser *et al.*, 2017; Hong *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2019; Obeid *et al.*, 2017; Van den Eynde *et al.*, 2018). Klíčové jsou metody umožňující mapovat nádorové mikroprostředí ve 3D v co nejkratším čase a s minimálními náklady. To dovolují právě projasňovací metody. Rozvoj těchto metodických přístupů pak bude katalyzovat výzkum v oblasti nádorové heterogenity ve 3D, čehož důkazem je v posledních letech rostoucí počet prací demonstrujících tento přístup (Hendry *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2019; Nojima *et al.*, 2017; Tanaka *et al.*, 2017).

### 6.1 VÝBĚR VHODNÉ PROJASŇOVACÍ TECHNIKY

V rámci práce byly otestovány tři projasňovací protokoly (CUBIC (Susaki *et al.*, 2015), PACT (Yang *et al.*, 2014), 3DSICO (Renier *et al.*, 2014)), které odrážejí rozdílné chemické přístupy ke zprůhlednění tkání popsané v úvodu práce. Jako referenční značení pro porovnání projasňovacích metod sloužily malé fluorescenční molekuly (DAPI, Hoechst 33342 a PI), které se vážou na nukleové kyseliny a zvýrazňují jádra (viz obr. 20, 22, 25). Značení jader slouží jako základ pro budoucí segmentaci tkáně či jednotlivých buněk a zároveň využití malých fluorescenčních molekul zefektivňuje screening projasňovacích technik ve dvou ohledech. Za prvé je možné použít kratší inkubační časy (jednu až dvě hodiny u PACT či 3DISCO metodiky (Renier *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014) pro 1mm vzorky) či v případě CUBIC metodiky značit vzorky přímo v projasňovacích roztocích (Susaki *et al.*, 2015). Za druhé díky bezproblémové difuzi do vzorku (Tyson *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2014) odrážejí absence či přítomnost signálu míru projasnění vzorku, a nikoliv schopnost molekuly difundovat do tkáně. V případě značení protilátkami je často důvodem ztráty

signálu ve větších hloubkách právě nedostatečná difuze takto velké molekuly hlouběji do tkáně (viz obr. 46).

Z testovaných projasňovacích metod byla vybrána CUBIC a to z několika důvodů. Za prvé poskytovala z testovaných protokolů vizuálně nejlépe projasněné tkáně (viz obr. 19), což potvrdila i kvantifikace průhlednosti tkání pomocí měření transmitance (viz obr. 18). Transmitance (tedy míra světla jež projde vzorkem) byla u CUBIC projasněných vzorků až 95% a u sleziny byla téměř dvakrát vyšší než při projasnění dvěma zbylými metodami (76% u CUBIC oproti 41% nebo 45% u PACT nebo 3DISCO). S tím korespondovala i vizuální detekce jader, která byla možná až do hloubky >400  $\mu\text{m}$  (viz obr. 20). Za druhé díky netoxickému a složení finálního roztoku, v němž jsou vzorky zobrazovány (CUBIC-2), je manipulace s nimi snadná a nevyžaduje speciální vybavení (digestor, ochranné pomůcky aj.). Za třetí nekoroziivnost CUBIC-2 roztoku, ve kterém jsou vzorky zobrazovány, umožňuje jejich umístění přímo do zobrazovací komůrky mikroskopu což je optimální pro zamezení degradaci signálu v důsledku optických aberací (tato problematika bude blíže diskutována níže v kontextu 3DISCO metody). Za čtvrté bylo potvrzeno, že CUBIC metodika je kompatibilní se značením jader fluorofory jak v modrém (DAPI), tak v červeném (PI) spektru (viz obr. 28), což poskytuje variabilitu při budoucím návrhu panelu použitých konjugovaných protilátek.

Výhodami PACT metodiky jsou podobně jako v případě CUBIC použití neagresivních a nekoroziivních roztoků, které umožňují snadnou manipulaci se vzorky a zobrazování přímo v komůrce mikroskopu. Průhlednost takto projasněných vzorků však nedosahovala průhlednosti vzorků projasněných CUBIC metodou (viz výše) a umožňovala vizuální odlišení jednotlivých jader jen do hloubky přibližně 200  $\mu\text{m}$  (viz obr. 20). To je v kontrastu s výsledky studie Xu *et al.*, (2019), kde CUBIC a PACT poskytují srovnatelné výsledky projasnění. Je obtížné identifikovat, co může být důvodem nedostatečného projasnění, vzhledem k neznámému složení použitých roztoků. Navíc je testovaná komerční sada pro projasňování PACT primárně určená pro zpracování mozkových tkání (dnes jsou již dostupné PACT sady specifické pro různé typy tkání (Tissue Clearing Kit). Ačkoliv naše experimenty (viz obr. 17, 18 a 19) ukázaly nedostatečnost projasnění tkání touto konkrétní sadou, nevylučují možnost použití jiných protokolů pro pasivní či aktivní CLARITY, které se ukázaly jako efektivní při projasňování nádorových tkání (Chen *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2014).

U 3DISCO metodiky (či jiných projasňovacích metod založených na organických rozpouštědlech) je výsledkem projasněná tkáň v roztoku organických rozpouštědel, která mohou vést ke korozi mikroskopu (Ertürk *et al.*, 2012; Richardson and Lichtman, 2015). Pro zobrazování na lightsheet mikroskopu Zeiss Lightsheet Z.1 je nutné uzavřít vzorek do skleněné kapiláry, aby nedošlo ke kontaktu částí mikroskopu s organickými rozpouštědly. Vzhledem ke korekci objektivů na index

lomu  $\sim 1,47$  jsou použity kapiláry ze speciálního boritokřemičitého skla s indexem lomu 1,472 a vzorek je převeden do roztoku s totožným indexem lomu (Carraro *et al.*, 2015). Umístěním vzorku do kapiláry však vzniká další optické rozhraní, na kterém i přes co nejlepší sjednocení indexů lomu dochází k rozptylu světla a degradaci signálu, jak bylo zřejmé jak ze ztráty kvality signálu ve všech třech kanálech (viz obr. 23) a potvrzeno kvantitativním měřením aberace způsobené kapilárou (viz obr. 24). Vzhledem k tomu, že homogenita indexů lomu médií byla ověřena refraktometrem (z přesností na  $\pm 0,001$ ), je pravděpodobně důvodem absorpce či rozptylu světla ve stěně použité kapiláry. Tento efekt bude ještě výraznější vzhledem k použití kapilár se silnější stěnou (5 mm namísto 1,6 mm) než v původní práci (Carraro *et al.*, 2015). Přesto, že sklo by mělo být teoreticky opticky homogenní a síla stěny by tak neměla mít vliv, v praxi vždy k absorpci či rozptylu světla dochází a je vhodné použití kapilár s co nejtenčí stěnou (Jacques Payssan, PhD, osobní sdělení).

Vzhledem ke zmíněným rizikům v podobě aberace a ztráty kvality signálu, které jsou spojeny s umístěním vzorku do skleněné kapiláry, bylo vyvinuto množství alternativních řešení pro zobrazování vzorků projasněných 3DISCO (či dalšími metodami založenými na použití organických rozpouštědel). Jedním z řešení je převod vzorku z roztoku organických rozpouštědel (nejčastěji DBE) do netoxického ethylcinamátu (Masselink *et al.*, 2019). To umožňuje zobrazování vzorku i mimo uzavřenou komůrku včetně zobrazování v Zeiss Z.1 mikroskopu při použití 5x/0.16 objektivu, který není ponořen přímo do zobrazovacího média. Další možností je zobrazování na jiném typu lightsheet mikroskopu, který má konstrukci, při níž je vzorek uzavřen tak, aby nedošlo ke styku vzorku s objektivem. Z komerčních řešení umožňují takové snímání například ultramikroskopy firmy Lavisision Biotec (Courties *et al.*, 2020). Z nekomerčních pak lightsheet mikroskop „open-top“ konstrukce (Glaser *et al.*, 2019) či vlastní řešení na základě open-SPIM iniciativy (OpenSPIM, 2016). Nově je možné využít i druhou generaci lightsheet mikroskopu od firmy Zeiss (Lightsheet 7), který umožňuje zobrazování v širší škále projasňovacích médií až do refrakčního indexu  $1,53 \pm 0,05$  (Schadwinkel *et al.*, 2020). Další možností je využití projasňovacích protokolů, které kombinují delipidaci vzorků v organických rozpouštědlech a poté projasňování pomocí vodných roztoků jako je například recentně publikovaný protokol kombinující iDISCO a CUBIC metodu (McKey *et al.*, 2020).

## 6.2 ZNAČENÍ PROJASNĚNÝCH TKÁNÍ MALÝMI MOLEKULAMI

Účel značení malými molekulami byl nastíněn v předešlé kapitole. Informace o jejich kompatibilitě s projasňovacími protokoly jsou však rozporuplné. Někteří autoři ukázali kompatibilitu CUBIC projasňování s DAPI značením (Davis *et al.*, 2016; Nehrhoff *et al.*, 2016; Y. Xu *et al.*, 2019), zatímco jiní reportovali zhášení fluorescence (J. Xu *et al.*, 2019). V této práci byla potvrzena kompatibilita DAPI s CUBIC protokolem (viz obr. 25 a 21). V případě Hoechst 33342 barviva, byla v prvním experimentu pozorována absence signálu z takto značených a CUBIC

projasněných tkání. To bylo v rozporu s reportovanou kompatibilitou s CUBIC protokolem (Kolesová *et al.*, 2016; McKey *et al.*, 2020) a byl proto proveden separátní experiment zaměřený na kvantitativní testování kompatibility CUBIC projasňování s DAPI, PI a Hoechst 33342 značením. V souladu s publikovanou literaturou se CUBIC protokol ukázal jako kompatibilní jak s oběma značeními v modrém kanále ((Davis *et al.*, 2016; McKey *et al.*, 2020; Nehrhoff *et al.*, 2016), tak s PI (Matsumoto *et al.*, 2019). Později bylo testováno ještě značení DRAQ5 ve vzdáleném červeném kanále také kompatibilní s CUBIC. Toto značení nebylo ale dále využito a sloužilo pouze jako záložní řešení v případě nemožnosti využít PI pro jeho přesvit do vzdáleného červeného kanálu.

Jak použití značek v modrém kanále (DAPI a Hoechst 33342), tak v červených kanálech (DRAQ5 či PI) sebou nese určitá omezení vzhledem k detekci v projasněných tkáních. V případě značek v modrém kanále s excitací v UV či spektru blízkém UV je v důsledku krátkých vlnových délek excitačního a emisního spektra výraznější rozptyl signálu z těchto značek ve tkáni, který může bránit detekci signálu z projasněných vzorků (Marx, 2016; Richardson and Lichtman, 2015). Spolu s tím může detekci komplikovat i vyšší absorpce CUBIC projasněných tkání ve vlnových délkách kolem 400 nm způsobená zbytky krevních barviv (Tainaka *et al.*, 2014). Efekt ztráty signálu v modrém kanále (nikoliv však v červeném) z hlubších částí vzorku byl pozorován i v tomto případě (viz obr. 26), přičemž homogenita EGFP signálu ve stejných snímcích vylučovala rozdíl v kvalitě projasnění mezi jednotlivými vzorky (viz obr. 27). Problém detekce signálu v modrém kanále (v kontrastu se značením v delších vlnových délkách) byl zaznamenán i v dalších experimentech (viz obr. 42). Přestože v některých publikovaných pracích bylo DAPI využito k detekci jader v projasněných tkáních (Davis *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2014) a to až do hloubek 600  $\mu\text{m}$  (Nehrhoff *et al.*, 2016), lze se na základě dat prezentovaných v této práci přiklonit k doporučení preferenčně využívat pro značení jader v projasněných tkáních značky v červeném (PI) či vzdáleném červeném (DRAQ5), případně v zeleném (SYTO 16, (Nojima *et al.*, 2017)) kanále, jejichž signál je méně náchylný k rozptylu (Marx, 2016).

Omezením v případě použití značek v červeném či vzdáleném červeném kanále může být jejich absorpce světla ve viditelném spektru a tím i zhoršení průhlednosti projasněné tkáně (Miller *et al.*, 2005). Proto byl, jak vliv PI, tak DRAQ5 na průhlednost projasněné tkáně otestován a vyhodnocen měřením relativní transmitance (viz obr. 30). Vliv propidium jodidu (PI) na průhlednost tkáně je výrazný pouze při použití v koncentraci 30  $\mu\text{g/ml}$ , která násobně přesahuje koncentrace použité v této práci (5  $\mu\text{g/ml}$  pro barvení CUBIC vzorků). V koncentraci 30  $\mu\text{g/ml}$ , který vede k menší transmitanci vzorku (59 % oproti 78 % u neznačené kontroly), bylo však PI použito při CUBIC projasňování a zobrazování celého myšího mozku (Matsumoto *et al.*, 2019). Lze

tak doporučit použití PI jako základního značení tkáně s tím, že je třeba vzít v potaz možný přesvit do vzdáleného červeného kanálu.

### 6.3 KORELACE DAT Z PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE A MIKROSKOPIE

Cytometrie je vhodnou metodou ověření funkčnosti značení protilátkami, jejich kompatibility s fixací či pro kontrolu úspěšné konjugace protilátky s fluorofory. To je umožněno menší variabilitou způsobenou přípravou vzorku, ale zejména díky tomu, že výsledkem cytometrických měření je inherentně kvantitativní informace (intenzita fluorescence dané měřené částice, většinou buňky) na rozdíl od fluorescenční mikroskopie, kde je výstupem obrazová informace vyžadující několikakrokový proces zpracování dat (korekce pozadí, analýza objektu pomocí segmentace, kvantifikace signálu pro jednotlivé objekty, grafické znázornění kvantitativních výsledků v podobě například histogramu) (Meijering *et al.*, 2016). Nedílnou součástí práce byl vývoj analytických prostředků umožňujících co možná nejprímější srovnání cytometrických a mikroskopických dat. Za tímto účelem bylo vytvořeno makro v open-source programu ImageJ (viz příloha 4), pro segmentaci, kvantifikaci a vizualizaci obrazových dat ve formě histogramů umožňující okamžité vizuální porovnání výsledků mikroskopické a cytometrické analýzy (viz obr. 31, 32 a 34).

Díky tomuto postupu jsme mohli přímo porovnat signál z námi naznačených protilátek jak na cytometru, tak na fluorescenčním mikroskopu a usnadnit tak výběr vhodné značky (protilátky) dostatečně jasné pro následnou segmentaci cílových buněk v projasněném vzorku. Pro ověření korelace mezi daty naměřenými pomocí průtokové cytometrie a pomocí mikroskopie bylo kvantifikováno zastoupení TCR-beta+ a CD4+ pozitivních buněk v suspenzi myších splenocytů a mezi metodami nebyl signifikantní rozdíl (viz tab. 2).

Bylo rozhodnuto využít měření signálu z kalibračních fluorescenčních kuliček jak na cytometru, tak na mikroskopech. Relativně k jejich intenzitě pak mezi sebou lze porovnávat mezi sebou data naměřená pomocí mikroskopie a průtokové cytometrie (absolutní srovnání dat znesnadňuje zejména rozdílná škála a systém detekce pomocí PMT či APD v případě cytometrie a CCD či CMOS kamer v případě mikroskopie).

Relace intenzity označených buněk ke kalibračním kuličkám však naráží na dva problémy. Přílišný jas kalibračních kuliček znemožnil přesnou kvantifikaci jejich fluorescence při nastavení mikroskopu, při němž lze detekovat námi označené buňky (fluorescence jasnější populace kalibračních kuliček je v tomto případě mimo škálu detektorů). Druhý problém je, že zůstává otevřenou otázkou nakolik je možné přímo korelovat absolutní hodnoty signálu z částic různých velikostí (v našem případě kuliček a buněk) mezi metodami vzhledem k rozdílnému přístupu k detekci a kvantifikaci signálu v případě mikroskopie a cytometrie (viz předchozí odstavce).

Vzhledem k těmto komplikacím bylo rozhodnuto orientovat se také podle poměru intenzity fluorescence polyklonálních a námi značených protilátek. Ta je v případě polyklonálních přibližně 10 násobná oproti námi značeným protilátkám (viz obr. 34). Pro ověření správnosti akvizičních parametrů jsme pak vycházeli z předpokladu, že intenzita námi značených buněk při detekci v mikroskopu přibližně odpovídá intenzitě slabších fluorescenčních kuliček (viz obr. 34).

## 6.4 IMMUNOHISTOCHEMICKÉ ZNAČENÍ PROJASNĚNÝCH TKÁNÍ

Ačkoliv kompatibilita CUBIC metody s protilátkami je dobře dokumentována (Nojima *et al.*, 2017; Susaki *et al.*, 2014; Tainaka *et al.*, 2018; Y. Xu *et al.*, 2019), nepodařilo se nám detekovat signál ani z anti-CD4 ani z anti-TCR-beta protilátek v projasněných tkáních (viz obr. 36 a 38). Absence signálu z námi značených protilátek u projasněných vzorků je s největší pravděpodobností dána synergií dvou efektů. Jedním je ztráta fluorescenčního signálu během projasňování a druhým počáteční nízká intenzita signálu z námi značených protilátek.

Pokles signálu z protilátek během projasňování může být způsobený vystavením tkáně působení močoviny a detergentů, které vede k eluaci značné části proteinů z tkáně (až 40% v případě metodiky zahrnující použití močoviny a 0,1% koncentrace detergentu). Navíc už samotné vystavení tkáně detergentu v 0,1% koncentraci (která je 15x nižší než v případě použité CUBIC metodiky) vede ke ztrátě přibližně 20 % proteinů (Hama *et al.*, 2015). K degradaci případných epitopů patrně přispívá i částečná denaturace proteinů močevinou přítomnou v projasňovacích roztocích (Richardson and Lichtman, 2015). Řešením by mohl být upravený CUBIC protokol bez druhého kroku (Kolesová *et al.*, 2016) eliminující inkubaci vzorku po samotném značení protilátkami.

Signál z námi konjugovaných anti-CD4 a anti-TCR-beta je přibližně o jeden řád nižší než signál z polyklonálních protilátek (viz obr. 34 a 35). V kombinaci s výraznou ztrátou signálu během projasňování (viz obr. 37, pokles z 91 % na 12 % v zeleném kanále či ze 100% na 18% ve vzdáleném červeném kanále) to vede k absenci pozitivního signálu z námi konjugovaných protilátek v projasněných tkáních (viz obr. 36 a 39) Pro vyloučení možnosti, že signál z námi značených protilátek nebyl detekován z důvodu vysokého pozadí v tkáni, bylo měření provedeno i na Lightsheet mikroskopu, kde dochází k excitaci signálu pouze v rovině ostrosti. Ani v tomto případě se nepodařilo detekovat pozitivní signál z CD4 či TCR-beta lymfocytů (viz obr. 31).

Řešením by bylo použití protilátek poskytujících jasnější fluorescenční signál, jak ilustruje detekce signálu v projasněných vzorcích značených polyklonálními protilátkami (viz obr. 39). Opačným řešením by bylo snížení autofluorescence vzorku, což by umožnilo detekci i slabšího signálu. Jedním z důvodů vysoké autofluorescence, zejména v zeleném kanále, může být přílišná fixace vzorků (Muntifering *et al.*, 2018; Stewart *et al.*, 2007). Snížení autofluorescence způsobené fixací

lze docílit optimalizací doby fixace či koncentrace fixativa (na druhé straně nedostatečná fixace tkáně povede k větší ztrátě proteinů během projasňování) (Muntifering *et al.*, 2018). Snížit autofluorescenci způsobenou fixací a endogenními fluorofory lze i předpřípravou tkáně inkubací v metanolu a peroxidu vodíku, která je součástí projasňovací metody iDISCO (Renier *et al.*, 2014)) a byla recentně využita i v kombinaci s CUBIC metodou (McKey *et al.*, 2020).

V případě, že by se CUBIC metoda ukázala jako nevhodná pro analýzu TIL v nádorové tkáni, lze využít jinou projasňovací metodu. Recentně byly publikovány dvě studie, které kombinují značení protilátkami a projasňování pro analýzu TIL. T3 metoda využívá projasnění roztokem 80% fruktózy a následné zobrazování na konfokálním mikroskopu k analýze CD3+ a CD8+ lymfocytů v myši i lidské nádorové tkáni získané jehlovou biopsií (Lee *et al.*, 2019). Obdobně byla k analýze nádorového mikroprostředí, včetně kvantifikace a lokalizace CD3+ T lymfocytů využita recentně i CLARITY metoda (Chen *et al.*, 2019).

## 6.5 ZOBRAZOVÁNÍ

Vzhledem k tomu že analýza vzorků pomocí lightsheet mikroskopie je náročná na čas i prostředky, bylo rozhodnuto v co největší možné míře využívat klasických mikroskopů, které jsou součástí vybavení laboratoře, zejména mikroskopu Zeiss Axiozoom V.16 s ApoTome, který umožňuje optické řezání na principu strukturované iluminace (Weigel *et al.*, 2009).

Hlavním rozdílem mezi detekcí na systému ApoTome a lightsheet mikroskopií je přítomnost signálu z oblastí mimo rovinu ostrosti. Zatímco u Axiozoomu je tento signál během akvizice přítomen a až později odečten od signálu z roviny ostrosti (Weigel *et al.*, 2009), u lightsheet mikroskopie není signál z oblastí mimo rovinu ostrosti přítomen vůbec (viz obr. 10). Bude-li signál z oblastí mimo rovinu ostrosti převyšovat intenzitu signálu z roviny ostrosti, na systému ApoTome dojde odečtením pozadí (signálu mimo rovinu ostrosti) k úplné ztrátě signálu. Z toho důvodu byla testována korelace kvality signálu v závislosti na zobrazení na Axiozoom V.16 s ApoTome nebo na lightsheet mikroskopu (viz obr. 40). Kvalita signálu mezi oběma mikroskopy korelovala (korelační koeficient  $p=0,62$ ) s výjimkou případu, kdy bylo ve vzorku vysoké pozadí (signál z AlexaFluor 488 protilátky v MHCII/EGFP slezině). V takovém případě byla kvalita signálu vyšší při snímání na lightsheet mikroskopu ( $SI = 5,4$ ) než na Axiozoom s ApoTome ( $SI = 2,0$ ). To je v souladu s výše popsáním efektem ztráty signálu v případě vzorku s vyšším pozadím na systému Axiozoom s ApoTome.

Signál z oblastí mimo rovinu ostrosti má trojí původ: autofluorescenci tkáně, fluorescenci nespecificky navázané značky (protilátka, malá molekula) či specifický signál z označeného objektu nacházejícího se mimo rovinu ostrosti. Právě poslední jmenovaný původ signálu z nezaostřených rovin přináší největší problém v případě využití systému Axiozoom s ApoTome pro

kontrolu kvality projasněných vzorků. Větší množství značených struktur v tkáni způsobí větší množství signálu z nezaostřených rovin a tím i silnější pozadí. To sníží intenzitu detekovaného signálu v poměru k pozadí a v krajním případě může vést až k úplné absenci signálu (viz obr. 34). Arteficiální ztráta signálu při odečtu pozadí pomocí ApoTome navíc byla pozorována i v případě pozitivního signálu z buněk značených protilátkami v hloubkách okolo 1 mm (viz obr. 42).

Kromě výše popsané ztráty signálu při použití ApoTome systému je navíc nutné pro odečtení pozadí pořídit pro každý snímek minimálně 3, lépe však 5 expozic. To znamená i delší dobu nutnou ke snímání a tím i větší riziko zhášení fluoroforů, úměrně k počtu pořízených expozic. Jako efektivnější pro evaluaci projasněných vzorků se ukázalo zobrazování v běžném módu a následné odečtení pozadí v SW ImageJ (viz obr. 42). Otevřenou otázkou však zůstává do jaké míry je možné predikovat kvalitu silných projasněných vzorků na základě dat z klasické mikroskopie. Zde může být absence signálu pouze zdánlivá v důsledku ztráty signálu ze zaostřené roviny v pozadí daném signálem z oblastí mimo rovinu ostrosti. Tento efekt byl pozorován v případě 1mm řezu projasněné tkáně zobrazované na lightsheet mikroskopu a na mikroskopu Axiozoom (viz obr. 43).

Pro zasazení těchto poznatků ohledně zobrazování projasněných vzorků do kontextu detekce a kvantifikace lymfocytů v nádorové tkáni je třeba vzít v potaz heterogenitu v počtech těchto buněk mezi nádory a pacienty (viz obr. 1). V případě CD3+ i CD8+ buněk se jejich denzita pohybuje od jednotek až po několik tisíc, a to jak v invazním okraji, tak centru nádoru (Pagès *et al.*, 2018). Na základě zde uvedených poznatků lze předpokládat, že tyto rozdíly by se projevíly v podobě ztráty signálu ve vzorcích s vysokým počtem TIL a znemožnily tak rigorózní kvantifikaci. Tato hypotéza by však měla být dále experimentálně testována. Pokud by nebyla vyvrácena, byl by to další z důkazů o benefitech využití lightsheet mikroskopie při hodnocení TIL ve 3D. Dosud publikované studie zabývající se kvantifikací lymfocytů v projasněné nádorové tkáni využívají majoritně konfokální či lightsheet mikroskopii (Chen *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2019, 2017; Nojima *et al.*, 2017; Tanaka *et al.*, 2017).

## 6.6 ANALÝZA DAT

Pro analýzu dat byla využita segmentace buněk na základě membránového značení v SW ImageJ (Li *et al.*, 2017) v kombinaci s analýzou v SW Imaris. Principem je inverze kanálu obsahujícího signál ze značených membrán, čímž dojde k vytvoření objektů, které je možné po prahování segmentovat jako jednotlivé částice. Takto vytvořenou binární masku oblastí obsahujících buňky jsme poté využili jako základ pro analýzu částic v Imaris. Zde byly odděleny buňky, které jsou v těsné blízkosti a tvoří shluky, což se projevuje na jejich spojení v jeden objekt v binární masce vytvořené v ImageJ (viz obr. 44 a 45). Další výhodou využití Imaris je možnost filtrovat objekty na základě průměrné intenzity ve vybraném kanále už během jejich analýzy. To je nutné zejména vzhledem k využití adaptivního prahování při přípravě masky v ImageJ. Adaptivní prahování je



použito proto, že je robustnější vůči proměnlivé intenzitě signálu a pozadí v různých částech vzorku. Vedlejším efektem adaptivního prahování je velké množství falešně pozitivních objektů i v oblastech bez pozitivního signálu. Takové objekty binární masky je možné odfiltrovat právě na základě absolutní intenzity fluorescence v původním kanále.

Obdobná analýza v ImageJ pomocí pluginu „3D object counter“ (Bolte and Cordelières, 2006) nevedla ani přes využití „3D watershed“ algoritmu k oddělení jednotlivých buněk ve shlucích a navíc neumožňovala analyzovat celý objem 1mm<sup>3</sup> vzhledem k velikost datasetu (3 GB). Řešení nabízí využití pluginů „3D ImageJ Suite“ (Ollion *et al.*, 2013), které umožňují analýzu takto velkých datasetů. Pro oddělení jednotlivých buněk tvořících shluky lze využít dvoukrokovou segmentaci. V prvním kroku jsou vyhledána lokální maxima, která v druhém kroku slouží k rozdělení a segmentaci objektů ve 3D (Legland *et al.*, 2016.). Výhodou analýzy pouze s využitím SW ImageJ by byla otevřenost takového řešení. Komerční SW Imaris byl využit vzhledem k tomu, že interaktivní povaha rozhraní komerčních SW umožňuje snazší a rychlejší vytvoření analýzy ovšem za cenu omezené reproducibility (ať už z důvodu licenčních nákladů či omezené otevřenosti použitého SW) (Heindl *et al.*, 2015).

Použití plně automatizované analýzy (ať už v komerčních programech či SW ImageJ) pro segmentaci a kvantifikaci částic je reprodučibilní a umožňuje analýzu i velkých objemů dat s malou časovou investicí (v porovnání s manuální kvantifikací, která je u velkých objemů v praxi téměř neproveditelná). Nevýhodou je však, vzhledem k heterogenitě vzorků dané biologickou variabilitou a přípravou a zobrazováním, menší robustnost a větší náchylnost k falešně pozitivním či falešně negativním detekcím (Chen *et al.*, 2019). Řešením může být semisupervizovaná analýza. Při té je v určitém kroku automatizované analýzy uživatelem zvolena vhodná hodnota (zpravidla v kroku prahování vzorku) v závislosti na konkrétním vzorku (Martin Čapek, osobní sdělení). Jinou možností by bylo využití trénovatelné WEKA segmentace v programu ImageJ již dříve využitě k analýze CD3 a CD8 pozitivních T buněk, případně vaskulatury v nádorové projasněné tkáni (Lee *et al.*, 2019).

## 6.7 ÚPRAVY CUBIC PROTOKOLU PRO LEPŠÍ PENETRACI PROTILÁTEK DO VZORKU

Majoritní překážkou pro detekci signálu z tkáně nebylo nedostatečné projasnění tkáně, což ilustruje detekce signálu jak z povrchu, tak z hloubky 0,25 (viz obr. 46) respektive 1 mm (viz obr. 43), ale nedostatečná penetrace protilátky. Ta může být způsobena více faktory. Vysoká denzita epitopu může vést k depleci protilátek na povrchu tkáně a k zabránění jejich další penetrace do vzorku (Tyson *et al.*, 2019). Zároveň může být překážkou pro penetraci protilátek do tkáně i větší množství extracelulární matrix (Noë *et al.*, 2018).

Z publikovaných modifikací, jejichž účelem je zlepšit penetraci protilátek (iDISCO protocol – iDISCO method., 2016; Lee and Sun, 2016; Nojima *et al.*, 2017) bylo otestováno zvýšení koncentrace protilátky (Chen *et al.*, 2019; iDISCO protocol – iDISCO method., 2016), použití centrifugace pro zlepšení penetrace protilátek (Daniel *et al.*, 2019; Lee and Sun, 2016; Noë *et al.*, 2018) či prodloužení inkubačních časů. Další možnosti by představovalo využití menších fragmentů protilátek (Harmsen and De Haard, 2007) nebo elektroforetického aparátu pro zlepšení penetrability vzorku či pro samotné urychlení difuze protilátek (Li *et al.*, 2015). Zvýšení koncentrace protilátek spolu s delší inkubací vedlo k lepšímu proznačení tkáně (viz obr. 46). Překvapivě jsme nepozorovali efekt v případě využití centrifugace (viz obr. 46), která by měla umožňovat velice rychlé probarvení vzorků (Lee and Sun, 2016). Nutno však podotknout, že v tomto případě jde o závěry vyvozené na základě pilotního experimentu a bude třeba je ověřit v separátních experimentech.

Metodika představená v této práci sestávající z využití 250  $\mu\text{m}$  řezů projasňovaných a značených v multijamkových destičkách a jejich následný screening pomocí widefield mikroskopu (zde Zeiss Axiozoom) a okamžitá semikvantitativní analýza v ImageJ, nabízí platformu pro testování různých modifikací protokolů pro značení projasněných vzorků protilátkami na konkrétních tkáních (viz obr. 40).

## 7 ZÁVĚR

Cílem této práce byl vývoj metodiky pro lokalizaci a kvantifikaci TIL ve 3D umožňující porovnání analýzy ve 3D s klasickou 2D histologií. Tato metodika by byla přínosem zejména k diagnostickým metodám jako Imunoskóre založeným na lokalizaci a kvantifikaci TIL na 2D řezech, které se stávají součástí klinické praxe. Práce demonstruje metodický přístup k mapování vlivu heterogenity na výsledky takových diagnostických metod i s jeho případnými úskalími.

V rámci práce byly otestovány tři projasňovací metody (3DISCO, CUBIC a PACT) zastupující různé chemické přístupy ke zprůhledňování tkáně. Na základě porovnání jednotlivých metod z hlediska efektivity projasňování tkáně, kompatibility s malými fluorescenčními molekulami a kvality signálu při snímání na Zeiss Z.1 Lightsheet mikroskopu byla zvolena CUBIC metoda. Ta byla také dále optimalizována a byla demonstrována její kompatibilita se značením protilátkami.

Značení CUBIC vzorků protilátkami však naráží na dva problémy. Prvním je nedostatečná penetrace protilátek do vzorku. Byl představen postup využívající 250  $\mu\text{m}$  řezy, zobrazování pomocí strukturované iluminace a následnou semikvantitativní analýzu v programu ImageJ, který umožňuje screening modifikací protokolu s cílem zlepšit proznačení vzorku. V pilotním experimentu byla jako ideální navržena kombinace vyšší koncentrace protilátky a delší doba značení. Druhým úskalím je ztráta fluorescence během projasňování, která limituje použití primárních protilátek konjugovaných s fluorofory, pokud tyto neposkytují dostatečně jasný signál. Pro budoucí snazší screening protilátek byl demonstrován způsob korelace dat mezi průtokovou cytometrií a mikroskopií.

Jako problematické se ukázalo použití alternativní mikroskopické metody k vyhodnocování kvality projasnění či značení u zprůhledněných vzorků. Při použití klasické mikroskopie s následným komputativním odečtením pozadí (zde demonstrovaným systémem Axiozoom) dochází k arteficiální ztrátě signálu s vyšším pozadím ve vzorku. Využití těchto metod sice práce nevylučuje, upozorňuje však na omezenou vypovídací hodnotu a množství proměnných, které je třeba vzít v potaz při budoucích experimentech.

Vzhledem k nekompatibilitě námi značených protilátek proti CD molekulám, nebylo možné provést porovnání 3D a 2D kvantifikace a zhodnocení vlivu heterogenity lymfocytárního infiltrátu na výsledky Imunoskóre metodiky. V minimální verzi s použitím polyklonálních protilátek jsme však demonstrovali projasnění a proznačení 1 mm silné tkáně, její následné snímání na lightsheet mikroskopu a poté 3D segmentaci a kvantifikaci jednotlivých buněk s využitím SW ImageJ a Imaris.

Tato práce poskytuje vhled do problematiky prostorové heterogenity v nádorovém mikroprostředí a demonstruje metodické přístupy směřující k jejímu kvantitativnímu hodnocení ale i úskalí, která tento směr provází.

## 8 PŘÍLOHY

### 8.1 PŘÍLOHA 1: VLASTNOSTI REŠERŠOVANÝCH FLUOROFORŮ A JEJICH ZDROJE

#### 8.1.1 VLASTNOSTI FLUOROFORŮ

Fluorofor	$\lambda_{\text{ex}}$	$\lambda_{\text{em}}$	$\epsilon$	$\Phi$	Jasnost	Dodavatel
Janelia Fluor 646, SE	646	664	152000	0,54	82,08	TOCRIS a biotechne brand
Atto 647N NHS ester	647	661	150000	0,65	97,5	Sigma Aldrich
CF 640R amine	642	662	105000	0,37	38,85	Sigma Aldrich
CF 647 amine	650	665	240000	n/a		Sigma Aldrich
AF 647 azide	648	671	270000	0,33	89,1	ThermoFisher Scientific
Cyanine 5, SE	649	666	250000	0,2	50	TOCRIS a biotechne brand
Alexa Fluor™ 488 NHS Ester	494	517	73000	0,92	67,16	ThermoFischer Scientific
Alexa Fluor™ 488 5-SDP Ester	494	517	73000	0,92	67,16	ThermoFischer Scientific
Alexa Fluor™ 488 5-TFP	494	517	73000	0,92	67,16	ThermoFischer Scientific
Andy Fluor™ 488 NHS Ester, SE	495	520	70000	n/a		Gene Copoeia
Alpha Fluor™ 488 NHS Ester	499	520	73000	0,92	67,16	AAT Bioquest
iFluor™ 488 succinimidyl ester	491	516	75000	0,9	67,5	AAT Bioquest
AFDye 488 NHS Ester	494	517	73000	n/a		Click Chemistry Tools
Atto 488	498	520	90000	0,8	72	Sigma Aldrich
FITC	494	520	75000	0,92	69	TOCRIS
5(6)-SFX (Fluorescein), SE	494	520	74000	n/a		TOCRIS
TFAX 488, SE	495	515	73000	0,92	67,16	TOCRIS
OG 488	496	516	76000	0,9	68,4	TOCRIS
Abberior STAR 488	504	525	79000	0,89	70,31	Abberior

### 8.1.2 ZDROJE FLUOROFORŮ

Fluorofor	Katalogové číslo	Cena (Kč)/mg	
<b>Janelia Fluor 646, SE</b>	6148	4656	<a href="https://www.tocris.com/products/janelia-fluor-646-se_6148">https://www.tocris.com/products/janelia-fluor-646-se_6148</a>
<b>Atto 647N NHS ester</b>	18373	10212	<a href="https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/18373">https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/18373</a>
<b>CF 640R amine</b>	SCJ4600040	7853	<a href="https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/scj4600040">https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/scj4600040</a>
<b>CF 647 amine</b>	SCJ4600045	7853	<a href="https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/scj4600045">https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/scj4600045</a>
<b>AF 647 azide</b>	A10277	24200	<a href="https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A10277">https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A10277</a>
<b>Cyanine 5, SE</b>	5436	420	<a href="https://www.tocris.com/products/cyanine-5-se_5436">https://www.tocris.com/products/cyanine-5-se_5436</a>
<b>Alexa Fluor™ 488 NHS Ester</b>	A20000	14133	<a href="https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A20000#/A20000">https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A20000#/A20000</a>
<b>Alexa Fluor™ 488 5-SDP Ester</b>	A30052	11882	<a href="https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A30052">https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A30052</a>
<b>Alexa Fluor™ 488 5-TFP</b>	A30005	13879	<a href="https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A30005">https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A30005</a>
<b>Andy Fluor™ 488 NHS Ester, SE</b>	L004	8319	<a href="https://www.genecopoeia.com/product/andy-fluor-488-nhs-ester-succinimidyl-ester/">https://www.genecopoeia.com/product/andy-fluor-488-nhs-ester-succinimidyl-ester/</a>
<b>Alpha Fluor™ 488 NHS Ester</b>	1812	5899	<a href="https://www.aatbio.com/products/alpha-fluor-488-nhs-ester">https://www.aatbio.com/products/alpha-fluor-488-nhs-ester</a>
<b>iFluor™ 488 succinimidyl ester</b>	1023	5899	<a href="https://www.aatbio.com/products/ifluor-488-succinimidyl-ester">https://www.aatbio.com/products/ifluor-488-succinimidyl-ester</a>
<b>AFDye 488 NHS Ester</b>	1338-1	4205	<a href="https://clickchemistrytools.com/product/afdye-488-nhs-ester/">https://clickchemistrytools.com/product/afdye-488-nhs-ester/</a>
<b>Atto 488</b>	41698-1MG-F	7696	<a href="https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/41698">https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/41698</a>
<b>FITC</b>	F2181	37	<a href="https://www.tocris.com/products/fitc_5440">https://www.tocris.com/products/fitc_5440</a>
<b>5(6)-SFX (Fluorescein), SE</b>	6488	435	<a href="https://www.tocris.com/products/5-6-sfx-fluorescein-se_6488">https://www.tocris.com/products/5-6-sfx-fluorescein-se_6488</a>
<b>TFAX 488, SE</b>	6619	7775	<a href="https://www.tocris.com/products/tfax-488-se_6619#product-details">https://www.tocris.com/products/tfax-488-se_6619#product-details</a>
<b>OG 488</b>	6257	1395	<a href="https://www.tocris.com/products/og-488-se_6257">https://www.tocris.com/products/og-488-se_6257</a>
<b>Abberior STAR 488</b>	ST488-0002-1MG	10807	<a href="https://www.abberior.com/jtl-shop/Abberior-STAR-488-NHS-ester-1-mg">https://www.abberior.com/jtl-shop/Abberior-STAR-488-NHS-ester-1-mg</a>

## 8.2 PŘÍLOHA 2: MAKRO PRO VYTVOŘENÍ SEGMENTAČNÍ MASKY PRO IMARIS V IMAGEJ

Vstupem pro makro je 32-bitový .RDF soubor vyexportovaný ze SW Huygens, obsahující jeden kanál a libovolný počet rovin v ose Z.

```
//Začátek makra

//Příprava snímku fluorescence lokalizované v membránách pro vytvoření binární masky pomocí prahování
run("Despeckle", "stack");
run("Subtract Background...", "rolling=50 stack");
run("Invert", "stack");
run("Enhance Contrast...", "saturated=0.1 normalize process_all use");
run("8-bit");

//Prahování a úprava binární masky
run("Auto Local Threshold", "method=Phansalkar radius=15 parameter_1=0 parameter_2=0 white stack");
run("Invert", "stack");
run("Despeckle", "stack");

//Rozdělení oblastí obsahujících větší množství objektů pomocí 3D watershed algorytmu
run("Distance Transform Watershed 3D", "distances=[Borgefors (3,4,5)] output=[16 bits] normalize dynamic=2 connectivity=6");

//Převod výstupu z funkce Distance Transform Watershed 3D na binární masku
setAutoThreshold("Default dark");
setThreshold(1, 65535);
setOption("BlackBackground", true);
run("Convert to Mask", "method=Default background=Dark black");

//Úprava binární masky a odstranění artefaktů (malých objektů) pomocí analýzy částic
run("Open", "stack");
run("Analyze Particles...", "size=100-Infinity pixel show=Masks clear stack");

//Konec makra

Výstupem je 8-bitová binární maska, která může být uložena ve formátu .tiff a konvertována pro další analýzu částic v programu Imaris
```

### 8.3 PŘÍLOHA 3: MAKRO PRO TVORBU MONTÁŽÍ SE ZVOLENOU ŠKÁLOU Z VÍCEKANÁLOVÝCH SNÍMKŮ A HISTOGRAMŮ V CELÉ ŠKÁLE

Vstupem je 16-bitový soubor v libovolném formátu obsahující více kanálu (a jednu rovinu, v případě více rovin je nejdříve třeba redukce z-dimenze)

```
//Začátek makra
```

```
//Definice proměnných pro pozdější uložení vytvořené montáže do stejné složky pod názvem  
původního souboru
```

```
dir = File.directory;
```

```
name = File.nameWithoutExtension;
```

```
Title = getTitle()
```

```
//Výběr kanálů začleněných do montáže a kalibrace snímku (musí být minimálně dva)
```

```
run("Make Substack...", "channels=[1, 3]");
```

```
run("Set Scale...", "distance=6.2314 known=1 unit=micron");
```

```
//Nastavení 16-bitové škály odpovídající celému rozsahu intenzitní škály snímků
```

```
setMinAndMax(0, 65535);
```

```
call("ij.ImagePlus.setDefault16bitRange", 16);
```

```
//Začátek části makra opakující se pro každý kanál zvolený pro začlenění do montáže
```

```
Stack.setChannel(1) //výběr konkrétního kanálu
```

```
run("Green"); //volba grafického podání snímku (barvy či „lookup table“)
```

```
setKeyDown("shift"); //zajišťuje logarytmické škálování histogramu
```

```
run("Histogram", "slice");
```

```
saveAs("Jpeg", dir + Title + "_histogram_of_1_channel.jpg"); //uložení histogramu ve formátu .jpg  
do složky v níž se nachází původní snímek se zvolenou příponou (v tomto případě  
_histogram_of_1_channel)
```

```
run("Close")
```

```
setMinAndMax(1000, 25000); //nastavení škály v níž bude zobrazen konkrétní kanál v montáži
```

```
//Konec části makra opakující se pro každý kanál zvolený pro začlenění do montáže
```

```
//Tvorba montáže více snímků s vloženým měřítkem
```

```
run("Make Montage...", "columns=2 rows=1 scale=0.5 border=5"); //nastavení parametrů  
montáže, součin „columns“ a „rows“ se musí rovnat počtu kanálů začleněných do montáže
```

```
run("Scale Bar...", "width=100 height=10 font=36 color=White background=None  
location=[Lower Left] bold overlay"); //volba parametrů měřítka
```



```
//Uložení montáže do stejné složky jako původní snánky ve formátu .jpg
```

```
saveAs("Jpeg", dir + Title + "_montage.jpg");
```

```
run("Close")
```

```
run("Close")
```

```
//Konec makra
```

Výstupem je montáž vybraných kanálu ve zvolených škálách obsahující měřítko a histogramy pro jednotlivé snímky v montáži (v celé škále).

## 8.4 PŘÍLOHA 4: MAKRO PRO SEGMENTACI KULIČEK, ČI SPLENOCYTŮ A NÁSLEDNÉ VYTVOŘENÍ HISTOGRAMŮ NASEGMENTOVANÝCH OBJEKTŮ

### 8.4.1 MAKRO PRO SEGMENTACI FLUORESCENČNÍCH KULIČEK

Vstupem je vícekanálový snímek fluorescenčních kuliček v 16-bitové škále (v případě více rovin je nejdříve třeba redukce z-dimenze)

```
//Začátek makra
```

```
//Optimalizace snímku (v tomto případě v modrém, tedy prvním kanále) pro prahování
```

```
run("Duplicate...", " ");
```

```
run("Subtract Background...", "rolling=100"); //poloměr (zde 100) je závislý na velikosti kuliček vůči velikosti pixelu
```

```
run("Median...", "radius=1");
```

```
//Tvorba ROI pro každou kuličku
```

```
setAutoThreshold("Default dark");
```

```
setThreshold(250, 65535); //třeba nastavit v závislosti na intenzitě kuliček v daném kanále
```

```
setOption("BlackBackground", true);
```

```
run("Convert to Mask");
```

```
run("Analyze Particles...", "size=5-100 circularity=0.5-1.00 add"); //parametr „size“ je závislý na velikosti kuliček vůči velikosti pixelu
```

```
close();
```

```
//Konec makra
```

Výstupem je ROI manager obsahující ROI pro každou kuličku, na jehož základě může být pomocí dalšího makra (viz kapitola v této příloze: Makro pro tvorbu histogramů průměrných fluorescenčních intenzit nasegmentovaných částic) analyzována a graficky znázorněna průměrná fluorescenční intenzita jednotlivých kuliček.

### 8.4.2 MAKRO PRO SEGMENTACI SPLENOCYTŮ

Vstupem je vícekanálový snímek splenocytů v 16-bitové škále (v případě více rovin je nejdříve třeba redukce z-dimenze), v tomto případě značených DAPI.

```
//Začátek makra
```

```
//Příprava snímku (v tomto případě v modrém, tedy prvním kanále) pro prahování
```

```
run("Duplicate...", " ");
```

```
run("Median...", "radius=5");
```

```
run("Subtract Background...", "rolling=100"); //poloměr (zde 100) je závislý na velikosti splenocytů vůči velikosti pixelu
```

```
//Tvorba ROI pro každý splenocyt
```

```
setAutoThreshold("Default dark");
```

```

setThreshold(1000, 65535); //třeba nastavit v závislosti na intenzitě splenocytů v daném kanále
setOption("BlackBackground", true);
run("Convert to Mask");
run("Dilate"); //dilatace masky je nutná vzhledem k segmentaci na základě jader, která jsou
menší než celá buňka, jejíž intenzita má být následně analyzována
run("Dilate");
run("Dilate");
run("Analyze Particles...", "size=50-200 circularity=0.5-1.00 add"); //parametr „size“ je závislý
na velikosti splenocytů vůči velikosti pixelu
close();
//Konec makra

```

Výstupem je ROI manager obsahující ROI pro každý jednotlivý splenocyt, na jehož základě může být pomocí dalšího makra (viz kapitola v této příloze: Makro pro tvorbu histogramů průměrných fluorescenčních intenzit nasegmentovaných částic) analyzována a graficky znázorněna průměrná fluorescenční intenzita jednotlivých kuliček.

#### 8.4.3 MAKRO PRO TVORBU HISTOGRAMŮ PRŮMĚRNÝCH FLUORESCENČNÍCH INTENZIT NASEGMENTOVANÝCH ČÁSTIC

Vstupem je jednokanálový snímek objektů (fluorescenčních kuliček či splenocytů) v 16-bitové škále (v případě více rovin je nejdříve třeba redukce z-dimenze) a ROI manager obsahující ROI pro každou částici jejíž intenzita má být změřena a vynesena do grafu (v našem případě byly ROI vytvořeny jedním z předešlých dvou maker v této příloze)

```

//Začátek makra
//Měření průměrné intenzity fluorescence pro jednotlivé částice
run("Set Measurements...", "mean display redirect=None decimal=0");
roiManager("Show All");
roiManager("Measure");

//Tvorba histogramu průměrných intenzit všech analyzovaných částic
run("Distribution...", "parameter=Mean or=100 and=0-6553"); //parameter „end“ odpovídá škále
která bude zobrazena na histogramu
run("Tile");
run("Clear Results");
//Konec makra

```

Výstupem je histogram intenzit analyzovaných částic, který může být následně uložen v libovolném formátu.

## 8.5 PŘÍLOHA 5: MAKRO PRO VYTVOŘENÍ GRAFU PRŮMĚRNÉ INTENZITY V RŮZNÝCH HLOUBKÁCH VZORKU

Vstupem je tříkanalový snímek libovolné bitové hloubky, obsahující více z-rovin, který je správně nakalibrován ve všech rozměrech.

```
//Začátek makra
```

```
//Definice proměnných pro pozdější uložení vytvořeného grafu do stejné složky pod názvem  
původního souboru
```

```
Title = getTitle()
```

```
dir = File.directory;
```

```
name = File.nameWithoutExtension;
```

```
//Zmenšení obrazu („binning“) pro urychlení analýzy větších souborů
```

```
run("Bin...", "x=2 y=2 z=1 bin=Average");
```

```
//Tvorba projekce maximální intenzity v ose XZ
```

```
getVoxelSize(vwidth, vheight, vdepth, vunit)
```

```
run("Reslice [/]...", "output=vwidth start=Left avoid");
```

```
run("Z Project...", "projection=[Max Intensity]");
```

```
newheight = getHeight()*(vdepth/vwidth);
```

```
run("Size...", "height=newheight interpolation=None");
```

```
//Tvorba ROI pro jednotlivé kanály
```

```
iwidth = getWidth();
```

```
iheight = getHeight();
```

```
bitdepth = bitDepth();
```

```
run("Line Width...", "line=iwidth")
```

```
Stack.setChannel(1)
```

```
makeLine(iwidth/2, iheight, iwidth/2, 1);
```

```
roiManager("Add");
```

```
Stack.setChannel(2)
```

```
makeLine(iwidth/2, iheight, iwidth/2, 1);
```

```
roiManager("Add");
```

```
Stack.setChannel(3)
```

```
makeLine(iwidth/2, iheight, iwidth/2, 1);
```

```
roiManager("Add");
```

```
//Měření intenzity v ose Z s využitím vytvořených ROI na snímku maximální intenzity v ose XZ  
v logarytické škále
```

```
roiManager("Multi Plot");
```

```
Plot.setLogScaleX(false);
```

```
Plot.setLogScaleY(true);
```

```
Plot.setLimits(0.0,(iheight*vheight),10,pow(2, bitdepth));
```

```
//Uložení výsledného grafu ve formátu .jpg do stejné složky v níž se nachází analyzovaný soubor  
pod jménem analyzovaného souboru s libovolnou příponou (zde _plot).
```

```
saveAs("Jpeg", dir + name + "_plot.jpg");
```

```
//Vyčištění pracovní plochy
```

```
roiManager("Select", newArray(0,1,2));
```

```
roiManager("Delete");
```

```
run("Close All");
```

```
//Konec makra
```

Výstupem je graf intenzity v jednotlivých z-rovinách (v různých hloubkách), s intenzitou v logarytmické škále, která umožňuje snazší vizuální porovnání snímků s velmi odlišnou intenzitou, případně porovnání velkého rozsahu intenzitních rozdílů v jednom snímku.

## 8.6 PŘÍLOHA 6: MAKRO PRO MĚŘENÍ PRŮMĚRNÉ INTENZITY FLUORESCENCE A JEJÍ SMĚRODATNÉ ODCHYLKY VE ZNAČENÝCH ČÁSTICÍCH A POZADÍ PRO KVANTIFIKACI STAINING INDEXU (SI)

Vstupem je vícekanálový snímek (v případě více rovin je nejdříve třeba redukce z-dimenze) v libovolné bitové škále a otevřený ROI manager.

```
//Začátek makra
```

```
//Nastavení měřených parametrů (průměrná intenzita fluorescence a směrodatná odchylka)
```

```
run("Set Measurements...", "mean standard redirect=None decimal=0");
```

```
//Začátek části makra opakující se pro každý kanál, který má být analyzován
```

```
//Duplikace kanálu pro tvorbu binární masky
```

```
run("Select None");
```

```
run("Duplicate...", "duplicate channels=1"); //výběr kanálu, který má být analyzován
```

```
run("Duplicate...", " ");
```

```
//Příprava pro prahování, vytvoření binární masky a její úprva
```

```
run("Enhance Contrast", "saturated=0.35");
```

```
run("Apply LUT");
```

```
run("Subtract Background...", "rolling=50"); //průměr (zde 50) bude záviset na velikosti značených struktur vzhledem k velikosti pixelu
```

```
run("Median...", "radius=2");
```

```
setAutoThreshold("Otsu dark");
```

```
setOption("BlackBackground", true);
```

```
run("Convert to Mask");
```

```
run("Open")
```

```
//Vytvoření ROI odpovídající pozadí a ROI odpovídající signálu na základě vytvořené masky
```

```
run("Create Selection");
```

```
roiManager("Add");
```

```
run("Make Inverse");
```

```
roiManager("Add");
```

```
run("Close")
```

```
run("Close")
```

```
//Měření průměrné intenzity fluoresce a směrodatné odchylky
```

```
Stack.setChannel(1) // výběr kanálu, který má být analyzován (odpovídá kanálu, který byl vybrán pro tvorbu binární masky)
```

```
roiManager("Select", 0);
```

```
run("Measure")
```

```
roiManager("Select", 1);
```

```
run("Measure")
```

```
roiManager("Select", newArray(0,1));
```

```
roiManager("Delete");
```

```
//Konec části makra opakující se pro každý kanál, který má být analyzován
```

```
//Konec makra
```

Výstupem jsou naměřené hodnoty průměrné intenzity fluorescence a směrodatné odchylky signálu a pozadí ve výsledkové tabulce v ImageJ. Tyto mohou být uloženy či zkopírovány do jiného programu pro výpočet staining indexu.

## 8.7 PŘÍLOHA 7: DETAILNÍ NASTAVENÍ FUNKCÍ PRO ANALÝZU V PROGRAMU IMARIS

### 8.7.1 FUNKCE „SURFACES“

#### [Algorithm]

Enable Region Of Interest = true

Process Entire Image = false

Enable Region Growing = false

Enable Tracking = false

Enable Shortest Distance = true

#### [Region of Interest]

Region1: XYZT from [184 184 1 1] to [1737 1737 868 1]

#### [Source Channel]

Source Channel Index = 1

Enable Smooth = true

Surface Grain Size = 1.14 um

Enable Eliminate Background = false

Diameter Of Largest Sphere = 4.28 um

#### [Threshold]

Enable Automatic Threshold = false

Manual Threshold Value = 100.384

Active Threshold = true

Enable Automatic Threshold B = true

Manual Threshold Value B = 254.737

Active Threshold B = false

#### [Classify Surfaces]

"Number of Voxels Img=1" above 100

### 8.7.2 FUNKCE „SPOTS“

#### [Algorithm]

Enable Region Of Interest = true

Process Entire Image = false

Enable Region Growing = false

Enable Tracking = false

Enable Region Growing = false



Enable Shortest Distance = true

[Region of Interest]

Region1: XYZT from [184 184 1 1] to [1737 1737 868 1]

[Source Channel]

Source Channel Index = 2

Estimated XY Diameter = 5.71 um

Estimated Z Diameter = 11.4 um

Background Subtraction = true

[Classify Spots]

"Quality" above 50.1

"Intensity Mean Ch=3 Img=1" above 3.00

## 9 SEZNAM LITERATURY

1. Aires, D.J., Yoshida, M., Richardson, S.K., Bai, M., Liu, L., Moreno, R., Lazar, A.J.F., Wick, J.A., Rich, B.E., Murphy, G., *et al.* (2019). T Cell Trafficking Plays an Essential Role in Tumor Immunity. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 99, 85–92.
2. Angell, H.K., Bruni, D., Barrett, J.C., Herbst, R., and Galon, J. (2020). The Immunoscore: Colon Cancer and Beyond. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 26, 332–339.
3. Angelova, M., Mlecnik, B., Vasaturo, A., Bindea, G., Fredriksen, T., Lafontaine, L., Buttard, B., Morgand, E., Bruni, D., Jouret-Mourin, A., *et al.* (2018). Evolution of Metastases in Space and Time under Immune Selection. *Cell* 175, 751–765.
4. Arganda-Carreras, I., Kaynig, V., Rueden, C., Eliceiri, K.W., Schindelin, J., Cardona, A., and Sebastian Seung, H. (2017). Trainable Weka Segmentation: a machine learning tool for microscopy pixel classification. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 33, 2424–2426.
5. Ariel, P. (2017). A beginner's guide to tissue clearing. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 84, 35–39.
6. Arlauckas, S.P., Garriss, C.S., Kohler, R.H., Kitaoka, M., Cuccarese, M.F., Yang, K.S., Miller, M.A., Carlson, J.C., Freeman, G.J., Anthony, R.M., *et al.* (2017). In vivo imaging reveals a tumor-associated macrophage mediated resistance pathway in anti-PD-1 therapy. *Sci. Transl. Med.* 9
7. Balkwill, F.R., Capasso, M., and Hagemann, T. (2012). The tumor microenvironment at a glance. *J. Cell Sci.* 125, 5591–5596.
8. Becht, E., de Reyniès, A., Giraldo, N.A., Pilati, C., Buttard, B., Lacroix, L., Selves, J., Sautès-Fridman, C., Laurent-Puig, P., and Fridman, W.H. (2016). Immune and Stromal Classification of Colorectal Cancer Is Associated with Molecular Subtypes and Relevant for Precision Immunotherapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 22, 4057–4066.
9. Besusparis, J., Plancoulaine, B., Rasmusson, A., Augulis, R., Green, A.R., Ellis, I.O., Laurinaviciene, A., Herlin, P., and Laurinavicius, A. (2016). Impact of tissue sampling on accuracy of Ki67 immunohistochemistry evaluation in breast cancer. *Diagn. Pathol.* 11, 82.
10. Bhome, R., Bullock, M.D., Al Saihati, H.A., Goh, R.W., Primrose, J.N., Sayan, A.E., and Mirnezami, A.H. (2015). A top-down view of the tumor microenvironment: structure, cells and signaling. *Front. Cell Dev. Biol.* 3.
11. Bindea, G., Mlecnik, B., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Waldner, M., Obenauf, A.C., Angell, H., Fredriksen, T., Lafontaine, L., Berger, A., *et al.* (2013). Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer. *Immunity* 39, 782–795.
12. Binnewies, M., Roberts, E.W., Kersten, K., Chan, V., Fearon, D.F., Merad, M., Coussens, L.M., Gabrilovich, D.I., Ostrand-Rosenberg, S., Hedrick, C.C., *et al.* (2018). Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat. Med.* 24, 541–550.
13. Blank, C.U., Haanen, J.B., Ribas, A., and Schumacher, T.N. (2016). The “cancer immunogram.” *Science* 352, 658–660.

14. Boes, M., Cerny, J., Massol, R., Op den Brouw, M., Kirchhausen, T., Chen, J., and Ploegh, H.L. (2002). T-cell engagement of dendritic cells rapidly rearranges MHC class II transport. *Nature* 418, 983–988.
15. Bolte, S., and Cordelières, F.P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J. Microsc.* 224, 213–232.
16. Booth, M.J., and Wilson, T. (2001). Refractive-index-mismatch induced aberrations in single-photon and two-photon microscopy and the use of aberration correction. *J. Biomed. Opt.* 6, 266–272.
17. Brenner, H., Kloor, M., and Pox, C.P. (2014). Colorectal cancer. *The Lancet* 383, 1490–1502.
18. Bronsert, P., Enderle-Ammour, K., Bader, M., Timme, S., Kuehs, M., Csanadi, A., Kayser, G., Kohler, I., Bausch, D., Hoepfner, J., *et al.* (2014). Cancer cell invasion and EMT marker expression: a three-dimensional study of the human cancer-host interface. *J. Pathol.* 234, 410–422.
19. Carraro, M., Paroutis, P., Woodside, M., and Harrison, R.V. (2015). Improved Imaging of Cleared Samples with ZEISS Lightsheet Z.1. Dostupné z <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.1.1875.4408>
20. Castle, J.C., Loewer, M., Boegel, S., de Graaf, J., Bender, C., Tadmor, A.D., Boisguerin, V., Bukur, T., Sorn, P., Paret, C., *et al.* (2014). Immunomic, genomic and transcriptomic characterization of CT26 colorectal carcinoma. *BMC Genomics* 15, 190.
21. Chang, A.Y., Bhattacharya, N., Mu, J., Setiadi, A.F., Carcamo-Cavazos, V., Lee, G.H., Simons, D.L., Yadegarynia, S., Hemati, K., Kapelner, A., *et al.* (2013). Spatial organization of dendritic cells within tumor draining lymph nodes impacts clinical outcome in breast cancer patients. *J. Transl. Med.* 11, 242.
22. Chen, H., Xia, B., Zheng, T., and Lou, G. (2020). Immunoscore system combining CD8 and PD-1/PD-L1: A novel approach that predicts the clinical outcomes for cervical cancer. *Int. J. Biol. Markers* 35, 65–73.
23. Chen, Y., Shen, Q., White, S.L., Gokmen-Polar, Y., Badve, S., and Goodman, L.J. (2019). Three-dimensional imaging and quantitative analysis in CLARITY processed breast cancer tissues. *Sci. Rep.* 9, 5264.
24. Chung, K., Wallace, J., Kim, S.-Y., Kalyanasundaram, S., Andalman, A.S., Davidson, T.J., Mirzabekov, J.J., Zalocusky, K.A., Mattis, J., Denisin, A.K., *et al.* (2013). Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature* 497, 332–337.
25. Cole, R.W., Jinadasa, T., and Brown, C.M. (2011). Measuring and interpreting point spread functions to determine confocal microscope resolution and ensure quality control. *Nat. Protoc.* 6, 1929–1941.
26. Collignon, A., Benciaaben, A., Kassambara, A., Guimaraes, F., Prestat, E., Haond, C., and Fieschi, J. (2019). Abstract 2796: Validation of Brightplex, a multiplexed IHC solution for immune cell phenotyping of the tumor microenvironment. *Cancer Res.* 79, 2796–2796.

27. Connolly, J.L., Schnitt, S.J., Wang, H.H., Longtine, J.A., Dvorak, A., and Dvorak, H.F. (2003). Tumor Structure and Tumor Stroma Generation v Holland-Frei Cancer Medicine. 6th Edition, (BC Decker). Dostupné z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13447>
28. Costantini, I., Cicchi, R., Silvestri, L., Vanzi, F., and Pavone, F.S. (2019). In-vivo and ex-vivo optical clearing methods for biological tissues: review. *Biomed. Opt. Express* 10, 5251–5267.
29. Courties, A., Belle, M., Senay, S., Cambon-Binder, A., Sautet, A., Chédotal, A., Berenbaum, F., and Sellam, J. (2020). Clearing method for 3-dimensional immunofluorescence of osteoarthritic subchondral human bone reveals peripheral cholinergic nerves. *Sci. Rep.* 10, 8852.
30. da Cunha, B.R., Domingos, C., Stefanini, A.C.B., Henrique, T., Polachini, G.M., Castelo-Branco, P., and Tajara, E.H. (2019). Cellular Interactions in the Tumor Microenvironment: The Role of Secretome. *J. Cancer* 10, 4574–4587.
31. Daniel, S., Meyer, K.J., Clark, A.F., Anderson, M.G., and McDowell, C.M. (2019). Effect of ocular hypertension on the pattern of retinal ganglion cell subtype loss in a mouse model of early-onset glaucoma. *Exp. Eye Res.* 185, 107703.
32. Data analysis & interpretation: HalioDx, 2020 [online]. [cit. 20-04-30] Dostupné z: <https://www.haliordx.com/en/biopharma-services/data-analysis-interpretation/>
33. Davis, F.M., Lloyd-Lewis, B., Harris, O.B., Kozar, S., Winton, D.J., Muresan, L., and Watson, C.J. (2016). Single-cell lineage tracing in the mammary gland reveals stochastic clonal dispersion of stem/progenitor cell progeny. *Nat. Commun.* 7.
34. Diederichsen, A.C.P., Hjelmberg, J. v B., Christensen, P.B., Zeuthen, J., and Fenger, C. (2003). Prognostic value of the CD4+/CD8+ ratio of tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer and HLA-DR expression on tumour cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 52, 423–428.
35. Dobosz, M., Ntziachristos, V., Scheuer, W., and Strobel, S. (2014). Multispectral fluorescence ultramicroscopy: three-dimensional visualization and automatic quantification of tumor morphology, drug penetration, and antiangiogenic treatment response. *Neoplasia* 16, 1–13.
36. Dongre, A., and Weinberg, R.A. (2019). New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20, 69–84.
37. Du, H., Hou, P., Zhang, W., and Li, Q. (2018). Advances in CLARITY-based tissue clearing and imaging. *Exp. Ther. Med.* 16, 1567–1576.
38. Duan, Q., Zhang, H., Zheng, J., and Zhang, L. (2020). Turning Cold into Hot: Firing up the Tumor Microenvironment. *Trends Cancer* 6, 605–618.
39. Dvorak, H.F. (2015). Tumors: Wounds that do not heal--Redux. *Cancer Immunol. Res.* 3, 1–11.
40. Egeblad, M., Nakasone, E.S., and Werb, Z. (2010). Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev. Cell* 18, 884–901.

41. Ertürk, A., Becker, K., Jährling, N., Mauch, C.P., Hojer, C.D., Egen, J.G., Hellal, F., Bradke, F., Sheng, M., and Dodt, H.-U. (2012). Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. *Nat. Protoc.* 7, 1983–1995.
42. Ertürk, A., Lafkas, D., and Chalouni, C. (2014). Imaging cleared intact biological systems at a cellular level by 3DISCO. *J. Vis. Exp. JoVE*. Dostupné z <https://dx.doi.org/10.3791/51382>
43. Evans, J.P., Sutton, P.A., Winiarski, B.K., Fenwick, S.W., Malik, H.Z., Vimalachandran, D., Tweedle, E.M., Costello, E., Palmer, D.H., Park, B.K., *et al.* (2016). From mice to men: Murine models of colorectal cancer for use in translational research. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 98, 94–105.
44. Feichtenbeiner, A., Haas, M., Büttner, M., Grabenbauer, G.G., Fietkau, R., and Distel, L.V. (2014). Critical role of spatial interaction between CD8+ and Foxp3+ cells in human gastric cancer: the distance matters. *Cancer Immunol. Immunother.* 63, 111–119.
45. Fixation. BioLegend | Your Partner for Antibodies, Proteins, Kits, Proteogenomics, Custom Services, and Reagents in Life Science, 2020 [online]. Copyright © 2020 BioLegend, Inc. [cit. 2020-01-29]. Dostupné z: <https://www.biolegend.com/en-us/fixation>
46. Foster, D.S., Jones, R.E., Ransom, R.C., Longaker, M.T., and Norton, J.A. (2018). The evolving relationship of wound healing and tumor stroma. *JCI Insight* 3.
47. Fridman, W.H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C., and Galon, J. (2012). The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer* 12, 298–306.
48. Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pages, Ch., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., Zizindohoue, F., Bruneval, P., Cugnenc, P-H., Trajanoski, Z., Fridman, W-H., Pages, F. (2006). Type, Density, and Location of Immune Cells Within Human Colorectal Tumors Predict Clinical Outcome. *Science* 313, 1960–1964.
49. Galon, J., and Bruni, D. (2019). Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies. *Nat. Rev. Drug Discov.* 18, 197–218.
50. Galon, J., Pagès, F., Marincola, F.M., Angell, H.K., Thurin, M., Lugli, A., Zlobec, I., Berger, A., Bifulco, C., Botti, G., *et al.* (2012). Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. *J. Transl. Med.* 10.
51. Galon, J., Angell, H.K., Bedognetti, D., and Marincola, F.M. (2013). The continuum of cancer immunosurveillance: prognostic, predictive, and mechanistic signatures. *Immunity* 39, 11–26.
52. Galon, J., Pagès, F., and Mlecnik, B. (2013). Method for quantifying immune cells in tumoral tissues and its applications.
53. Galon, J., Mlecnik, B., Bindea, G., Angell, H.K., Berger, A., Lagorce, C., Lugli, A., Zlobec, I., Hartmann, A., Bifulco, C., *et al.* (2014). Towards the introduction of the ‘Immunoscore’ in the classification of malignant tumours: Immunoscore classification of malignant tumours. *J. Pathol.* 232, 199–209.

54. Gaustad, J.-V., Simonsen, T.G., Andersen, L.M.K., and Rofstad, E.K. (2017). Vascular abnormalities and development of hypoxia in microscopic melanoma xenografts. *J. Transl. Med.* 15, 241.
55. Giese, M.A., Hind, L.E., and Huttenlocher, A. (2019). Neutrophil plasticity in the tumor microenvironment. *Blood* 133, 2159–2167.
56. Glaser, A.K., Reder, N.P., Chen, Y., McCarty, E.F., Yin, C., Wei, L., Wang, Y., True, L.D., and Liu, J.T.C. (2017). Light-sheet microscopy for slide-free non-destructive pathology of large clinical specimens. *Nat. Biomed. Eng.* 1.
57. Glaser, A.K., Reder, N.P., Chen, Y., Yin, C., Wei, L., Kang, S., Barner, L.A., Xie, W., McCarty, E.F., Mao, C., *et al.* (2019). Multi-immersion open-top light-sheet microscope for high-throughput imaging of cleared tissues. *Nat. Commun.* 10, 2781.
58. Gonzalez, H., Hagerling, C., and Werb, Z. (2018). Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes Dev.* 32, 1267–1284.
59. Greaves, M., and Maley, C.C. (2012). Clonal evolution in cancer. *Nature* 481, 306–313.
60. Griswold, D.P., and Corbett, T.H. (1975). A colon tumor model for anticancer agent evaluation. *Cancer* 36, 2441–2444.
61. Guidoboni, M., Gafà, R., Viel, A., Doglioni, C., Russo, A., Santini, A., Del Tin, L., Macrì, E., Lanza, G., Boiocchi, M., *et al.* (2001). Microsatellite Instability and High Content of Activated Cytotoxic Lymphocytes Identify Colon Cancer Patients with a Favorable Prognosis. *Am. J. Pathol.* 159, 297–304.
62. Hama, H., Hioki, H., Namiki, K., Hoshida, T., Kurokawa, H., Ishidate, F., Kaneko, T., Akagi, T., Saito, T., Saido, T., *et al.* (2015). ScaleS: an optical clearing palette for biological imaging. *Nature Neuroscience* 18, 1518–1529.
63. Hanahan, D., and Coussens, L.M. (2012). Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell* 21, 309–322.
64. Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674.
65. Harmsen, M.M., and De Haard, H.J. (2007). Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 13–22.
66. Heindl, A., Nawaz, S., and Yuan, Y. (2015). Mapping spatial heterogeneity in the tumor microenvironment: a new era for digital pathology. *Lab. Invest.* 95, 377–384.
67. Hendry, S., Salgado, R., Gevaert, T., Russell, P.A., John, T., Thapa, B., Christie, M., van de Vijver, K., Estrada, M.V., Gonzalez-Ericsson, P.I., *et al.* (2017). Assessing Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method from the International Immuno-Oncology Biomarkers Working Group. *Adv. Anat. Pathol.* 24, 311–335.
68. Hong, S.-M., Noë, M., Hruban, C.A., Thompson, E.D., Wood, L.D., and Hruban, R.H. (2019). A “Clearer” View of Pancreatic Pathology: A Review of Tissue Clearing and Advanced Microscopy Techniques. *Adv. Anat. Pathol.* 26, 31–39.

69. iDISCO protocol – iDISCO method. iDISCO method – Resources for whole-mount immunostaining and volume imaging, 2016 [online]. [cit. 2020-07-02] Dostupné z: <https://idisco.info/idisco-protocol/>
70. Immunoscore® IC in Lung Cancer: HalioDx. HalioDx: HalioDx, 2020 [online]. [2020-04-30] Dostupné z: <https://www.haliordx.com/diagnostic/immunoscorer-ic-in-lung-cancer/>
71. Jacques, S., L. (2013) Optical properties of biological tissues: a review. *Phys. Med. Biol.* 58, R37-R61.
72. Jansen, I., Lucas, M., Savci-Heijink, C.D., Meijer, S.L., Liem, E.I.M.L., de Boer, O.J., van Leeuwen, T.G., Marquering, H.A., and de Bruin, D.M. (2019). Three-dimensional histopathological reconstruction of bladder tumours. *Diagn. Pathol.* 14, 25.
73. John, B.A., and Said, N. (2017). Insights from animal models of bladder cancer: recent advances, challenges, and opportunities. *Oncotarget* 8.
74. Ke, M.-T., Fujimoto, S., and Imai, T. (2013). SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. *Nat. Neurosci.* 16, 1154–1161.
75. Kim, J.H., Jang, M.J., Choi, J., Lee, E., Song, K., Cho, J., Kim, K.-T., Cha, H.-J., and Sun, W. (2018). Optimizing tissue-clearing conditions based on analysis of the critical factors affecting tissue-clearing procedures. *Sci. Rep.* 8.
76. Kim, S.-Y., Cho, J.H., Murray, E., Bakh, N., Choi, H., Ohn, K., Ruelas, L., Hubbert, A., McCue, M., Vassallo, S.L., *et al.* (2015). Stochastic electrotransport selectively enhances the transport of highly electromobile molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, E6274–E6283.
77. Kolesová, H., Čapek, M., Radochová, B., Janáček, J., and Sedmera, D. (2016). Comparison of different tissue clearing methods and 3D imaging techniques for visualization of GFP-expressing mouse embryos and embryonic hearts. *Histochem. Cell Biol.* 146, 141–152.
78. Kong, J.C., Guerra, G.R., Pham, T., Mitchell, C., Lynch, A.C., Warriar, S.K., Ramsay, R.G., and Heriot, A.G. (2019). Prognostic Impact of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Primary and Metastatic Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Dis. Colon Rectum* 62, 498–508.
79. Kroeger, D.R., Milne, K., and Nelson, B.H. (2016). Tumor-Infiltrating Plasma Cells Are Associated with Tertiary Lymphoid Structures, Cytolytic T-Cell Responses, and Superior Prognosis in Ovarian Cancer. *Clin. Cancer Res.* 22, 3005–3015.
80. Kubota, S.I., Takahashi, K., Nishida, J., Morishita, Y., Ehata, S., Tainaka, K., Miyazono, K., and Ueda, H.R. (2017). Whole-Body Profiling of Cancer Metastasis with Single-Cell Resolution. *Cell Rep.* 20, 236–250.
81. Kwan, R., Looi, K.S., and Omary, M.B. (2015). Absence of keratins 8 and 18 expression in rodent epithelial cell lines associates with keratin gene mutation and DNA methylation: cell line selective effects on cell invasion. *Exp. Cell Res.* 335, 12–22.
82. Lal, G., Shaila, M.S., and Nayak, R. (2006). Activated mouse T cells downregulate, process and present their surface TCR to cognate anti-idiotypic CD4+ T cells. *Immunol. Cell Biol.* 84, 145–153.

83. Landskron, G., De la Fuente, M., Thuwajit, P., Thuwajit, C., and Hermoso, M.A. (2014). Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J. Immunol. Res.* 2014, 149185.
84. Le, D.T., Uram, J.N., Wang, H., Bartlett, B.R., Kemberling, H., Eyring, A.D., Skora, A.D., Lubber, B.S., Azad, N.S., Laheru, D., *et al.* (2015). PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N. Engl. J. Med.* 372, 2509–2520.
85. Lee, E., and Sun, W. (2016). ACT-PRESTO: Biological Tissue Clearing and Immunolabeling Methods for Volume Imaging. *J. Vis. Exp.* Dostupné z <http://dx.doi.org/10.3791/54904>
86. Lee, E., Choi, J., Youhwa, J., Kim, J.Y., Jang, Y.J., Hye, L.M., Kim, S.Y., Lee, H.-J., Cho, K., Jung, N., *et al.* (2016). ACT-PRESTO: Rapid and consistent tissue clearing and labeling method for 3-dimensional (3D) imaging. *Sci. Rep.* 6.
87. Lee, S.S.-Y., Bindokas, V.P., and Kron, S.J. (2017). Multiplex three-dimensional optical mapping of tumor immune microenvironment. *Sci. Rep.* 7.
88. Lee, S.S.-Y., Bindokas, V.P., Lingen, M.W., and Kron, S.J. (2019). Non-destructive, multiplex three-dimensional mapping of immune infiltrates in core needle biopsy. *Lab. Invest.* 99, 1400–1413.
89. Legland, D., Arganda-Carreras, I., and Andrey, P. (2016). MorphoLibJ: integrated library and plugins for mathematical morphology with ImageJ. *Bioinformatics* 32, 3532–3534.
90. Li, X.-F., and O'Donoghue, J.A. (2008). Hypoxia in Microscopic Tumors. *Cancer Lett.* 264, 172–180.
91. Li, J., Czajkowski, D.M., Li, X., and Shao, Z. (2015). Fast immuno-labeling by electrophoretically driven infiltration for intact tissue imaging. *Sci. Rep.* 5.
92. Li, W., Germain, R.N., and Gerner, M.Y. (2017). Multiplex, quantitative cellular analysis in large tissue volumes with clearing-enhanced 3D microscopy (Ce3D). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E7321–E7330.
93. Li, X., Gruosso, T., Zuo, D., Omeroglu, A., Meterissian, S., Guiot, M.-C., Salazar, A., Park, M., and Levine, H. (2019). Infiltration of CD8+ T cells into tumor cell clusters in triple-negative breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116, 3678–3687.
94. Li, Y., Xu, J., Wan, P., Yu, T., and Zhu, D. (2018). Optimization of GFP Fluorescence Preservation by a Modified uDISCO Clearing Protocol. *Front. Neuroanat.* 12, 67.
95. Liang, Y., Wang, F., Treanor, D., Magee, D., Roberts, N., Teodoro, G., Zhu, Y., and Kong, J. (2016). A Framework for 3D Vessel Analysis using Whole Slide Images of Liver Tissue Sections. *Int. J. Comput. Biol. Drug Des.* 9, 102–119.
96. Lloyd-Lewis, B., Davis, F.M., Harris, O.B., Hitchcock, J.R., Lourenco, F.C., Pasche, M., and Watson, C.J. (2016). Imaging the mammary gland and mammary tumours in 3D: optical tissue clearing and immunofluorescence methods. *Breast Cancer Res.* 18, 127.
97. Marx, V. (2016). Optimizing probes to image cleared tissue. *Nat. Methods* 13, 205–209.



98. Masselink, W., Reumann, D., Murawala, P., Pasierbek, P., Taniguchi, Y., Bonnay, F., Meixner, K., Knoblich, J.A., and Tanaka, E.M. (2019). Broad applicability of a streamlined ethyl cinnamate-based clearing procedure. *Development* 146.
99. Matsumoto, K., Mitani, T.T., Horiguchi, S.A., Kaneshiro, J., Murakami, T.C., Mano, T., Fujishima, H., Konno, A., Watanabe, T.M., Hirai, H., *et al.* (2019). Advanced CUBIC tissue clearing for whole-organ cell profiling. *Nat. Protoc.* 14, 3506–3537.
100. McKey, J., Cameron, L.A., Lewis, D., Batchvarov, I.S., and Capel, B. (2020). Combined iDISCO and CUBIC tissue clearing and lightsheet microscopy for in toto analysis of the adult mouse ovary†. *Biol. Reprod.* 102.
101. Mei, Z., Liu, Y., Liu, C., Cui, A., Liang, Z., Wang, G., Peng, H., Cui, L., and Li, C. (2014). Tumour-infiltrating inflammation and prognosis in colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *Br. J. Cancer* 110, 1595–1605.
102. Meijering, E., Carpenter, A.E., Peng, H., Hamprecht, F.A., and Olivo-Marin, J.-C. (2016). Imagining the future of bioimage analysis. *Nat. Biotechnol.* 34, 1250–1255.
103. Miller, C.E., Thompson, R.P., Bigelow, M.R., Gittinger, G., Trusk, T.C., and Sedmera, D. (2005). Confocal imaging of the embryonic heart: how deep? *Microsc. Microanal. Off. J. Microsc. Soc. Am. Microbeam Anal. Soc. Microsc. Soc. Can.* 11, 216–223.
104. Mlecnik, B., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Berger, A., Bindea, G., Meatchi, T., Bruneval, P., Trajanoski, Z., Fridman, W.-H., Pagès, F., *et al.* (2011). Histopathologic-Based Prognostic Factors of Colorectal Cancers Are Associated With the State of the Local Immune Reaction. *J. Clin. Oncol.* 29, 610–618.
105. Mlecnik, B., Bindea, G., Kirilovsky, A., Angell, H.K., Obenauf, A.C., Tosolini, M., Church, S.E., Maby, P., Vasaturo, A., Angelova, M., *et al.* (2016a). The tumor microenvironment and Immunoscore are critical determinants of dissemination to distant metastasis. *Sci. Transl. Med.* 8, 327ra26-327ra26.
106. Mlecnik, B., Bindea, G., Angell, H.K., Maby, P., Angelova, M., Tougeron, D., Church, S.E., Lafontaine, L., Fischer, M., Fredriksen, T., *et al.* (2016b). Integrative Analyses of Colorectal Cancer Show Immunoscore Is a Stronger Predictor of Patient Survival Than Microsatellite Instability. *Immunity* 44, 698–711.
107. Mlecnik, B., Van den Eynde, M., Bindea, G., Church, S.E., Vasaturo, A., Fredriksen, T., Lafontaine, L., Haicheur, N., Marliot, F., Debetancourt, D., *et al.* (2018). Comprehensive Intrametastatic Immune Quantification and Major Impact of Immunoscore on Survival. *J. Natl. Cancer Inst.* 110, 97–108.
108. Mollica Poeta, V., Massara, M., Capucetti, A., and Bonecchi, R. (2019). Chemokines and Chemokine Receptors: New Targets for Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol.* 10.
109. Muntifering, M., Castranova, D., Gibson, G.A., Meyer, E., Kofron, M., and Watson, A.M. (2018). Clearing for Deep Tissue Imaging. *Curr. Protoc. Cytom.* 86, e38.
110. Murray, E., Cho, J.H., Goodwin, D., Ku, T., Swaney, J., Kim, S.-Y., Choi, H., Park, Y.-G., Park, J.-Y., Hubbert, A., *et al.* (2015). Simple, Scalable Proteomic Imaging for High-Dimensional Profiling of Intact Systems. *Cell* 163, 1500–1514.

111. Naito, Y., Saito, K., Shiiba, K., Ohuchi, A., Saigenji, K., Nagura, H., and Ohtani, H. (1998). CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res.* 58, 3491–3494.
112. Najafi, M., Goradel, N.H., Farhood, B., Salehi, E., Solhjoo, S., Toolee, H., Kharazinejad, E., and Mortezaee, K. (2019). Tumor microenvironment: Interactions and therapy. *J. Cell. Physiol.* 234, 5700–5721.
113. Nawaz, S., and Yuan, Y. (2016). Computational pathology: Exploring the spatial dimension of tumor ecology. *Cancer Lett.* 380, 296–303.
114. NCI Dictionary of Cancer Terms - National Cancer Institute. Comprehensive Cancer Information - National Cancer Institute [online]. [cit. 2020-07-14] Dostupné z: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/tumor-microenvironment>
115. Neckel, P.H., Mattheus, U., Hirt, B., Just, L., and Mack, A.F. (2016). Large-scale tissue clearing (PACT): Technical evaluation and new perspectives in immunofluorescence, histology and ultrastructure. *Sci. Rep.* 6, 34331.
116. Nehrhoff, I., Bocancea, D., Vaquero, J., Vaquero, J.J., Ripoll, J., Desco, M., and Gómez-Gaviro, M.V. (2016). 3D imaging in CUBIC-cleared mouse heart tissue: going deeper. *Biomed. Opt. Express* 7, 3716–3720.
117. Nielsen, J.S., Sahota, R.A., Milne, K., Kost, S.E., Nesslinger, N.J., Watson, P.H., and Nelson, B.H. (2012). CD20+ tumor-infiltrating lymphocytes have an atypical CD27-memory phenotype and together with CD8+ T cells promote favorable prognosis in ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* 18, 3281–3292.
118. Noë, M., Rezaee, N., Asrani, K., Skaro, M., Groot, V.P., Wu, P.-H., Olson, M.T., Hong, S.-M., Kim, S.J., Weiss, M.J., *et al.* (2018). Immunolabeling of Cleared Human Pancreata Provides Insights into Three-Dimensional Pancreatic Anatomy and Pathology. *Am. J. Pathol.* 188, 1530–1535.
119. Nojadeh, J.N., Behrouz Sharif, S., and Sakhinia, E. (2018). Microsatellite instability in colorectal cancer. *EXCLI J.* 17, 159–168.
120. Nojima, S., Susaki, E.A., Yoshida, K., Takemoto, H., Tsujimura, N., Iijima, S., Takachi, K., Nakahara, Y., Tahara, S., Ohshima, K., *et al.* (2017). CUBIC pathology: three-dimensional imaging for pathological diagnosis. *Sci. Rep.* 7, 9269.
121. Nono, A.D., Chen, K., and Liu, X. (2019). Comparison of different functional prediction scores using a gene-based permutation model for identifying cancer driver genes. *BMC Med. Genomics* 12, 22.
122. Noy, R., and Pollard, J.W. (2014). Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. *Immunity* 41, 49–61.
123. Obeid, J.M., Hu, Y., Erdag, G., Leick, K.M., and Slingluff, C.L. (2017). The heterogeneity of tumor-infiltrating CD8+ T cells in metastatic melanoma distorts their quantification: how to manage heterogeneity? *Melanoma Res.* 27, 211–217.

124. Ollion, J., Cochenne, J., Loll, F., Escudé, C., and Boudier, T. (2013). TANGO: a generic tool for high-throughput 3D image analysis for studying nuclear organization. *Bioinformatics* 29, 1840–1841.
125. OpenSPIM. OpenSPIM, 2016 [online]. [cit. 2020-07-09] Dostupné z: <https://openspim.org/>
126. Ostrand-Rosenberg, S. (2010). Myeloid-derived suppressor cells: more mechanisms for inhibiting antitumor immunity. *Cancer Immunol. Immunother.* 59, 1593–1600.
127. Pagès, F., Anne, B., Matthieu, C., Fatima, S.-C., Anne, C., Robert, M., Bernhard, M., Amos, K., Malin, N., Diane, D., *et al.* (2005). Effector Memory T Cells, Early Metastasis, and Survival in Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* 13.
128. Pagès, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Asslaber, M., Tosolini, M., Bindea, G., Lagorce, C., Wind, P., Marliot, F., Bruneval, P., *et al.* (2009). In Situ Cytotoxic and Memory T Cells Predict Outcome in Patients With Early-Stage Colorectal Cancer. *J. Clin. Oncol.* 27, 5944–5951.
129. Pagès, F., Mlecnik, B., Marliot, F., Bindea, G., Ou, F.-S., Bifulco, C., Lugli, A., Zlobec, I., Rau, T.T., Berger, M.D., *et al.* (2018). International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *The Lancet* 391, 2128–2139.
130. Pan, C., Cai, R., Quacquarelli, F.P., Ghasemigharagoz, A., Lourbopoulos, A., Matryba, P., Plesnila, N., Dichgans, M., Hellal, F., and Ertürk, A. (2016). Shrinkage-mediated imaging of entire organs and organisms using uDISCO. *Nat. Methods* 13, 859–867.
131. Peranzoni, E., Lemoine, J., Vimeux, L., Feuillet, V., Barrin, S., Kantari-Mimoun, C., Bercovici, N., Guérin, M., Biton, J., Ouakrim, H., *et al.* (2018). Macrophages impede CD8 T cells from reaching tumor cells and limit the efficacy of anti-PD-1 treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, E4041–E4050.
132. Poola, P.K., Afzal, M.I., Yoo, Y., Kim, K.H., and Chung, E. (2019). Light sheet microscopy for histopathology applications. *Biomed. Eng. Lett.* 9, 279–291.
133. Rak, J., Yu, J.L., Klement, G., and Kerbel, R.S. (2000). Oncogenes and angiogenesis: signaling three-dimensional tumor growth. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 5, 24–33.
134. Reder, N.P., Glaser, A.K., McCarty, E.F., True, L.D., and Liu, J.T. (2019). Open-top light-sheet (OTLS) fluorescence microscopy image atlas of prostate core-needle biopsies. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 143, 1069–1075.
135. Renier, N., Wu, Z., Simon, D.J., Yang, J., Ariel, P., and Tessier-Lavigne, M. (2014). iDISCO: A Simple, Rapid Method to Immunolabel Large Tissue Samples for Volume Imaging. *Cell* 159, 896–910.
136. Richardson, D.S., and Lichtman, J.W. (2015). Clarifying Tissue Clearing. *Cell* 162, 246–257.
137. Richardson, D.S., and Lichtman, J.W. (2017). SnapShot: Tissue Clearing. *Cell* 171, 496–496.e1.

138. Roberts, N., Magee, D., Song, Y., Brabazon, K., Shires, M., Crellin, D., Orsi, N.M., Quirke, R., Quirke, P., and Treanor, D. (2012). Toward Routine Use of 3D Histopathology as a Research Tool. *Am. J. Pathol.* 180, 1835–1842.
139. Salmon, H., Franciszkiewicz, K., Damotte, D., Dieu-Nosjean, M.-C., Validire, P., Trautmann, A., Mami-Chouaib, F., and Donnadieu, E. (2012). Matrix architecture defines the preferential localization and migration of T cells into the stroma of human lung tumors. *J. Clin. Invest.* 122, 899–910.
140. Samson, A.A.S., Hong, S., Purushothaman, B., Lee, J., and Song, J.M. (2020). Transparent tumor microenvironment: Are liposomal nanoparticles sufficient for drug delivery to hypoxic regions and clonogenic cells? *Appl. Mater. Today* 19, 100561.
141. Santos, P.M., and Butterfield, L.H. (2018). Dendritic Cell-Based Cancer Vaccines. *J. Immunol. Baltim.* 200, 443–449.
142. Satake, A., Inoue, T., Kubo, S., Taniguchi, Y., Imado, T., Fujioka, T., Horiuchi, M., Xu, Y., Ikegame, K., Yoshihara, S., *et al.* (2010). Separation of antileukemic effects from graft-versus-host disease in MHC-haploidentical murine bone marrow transplantation: participation of host immune cells. *Int. J. Hematol.* 91, 485–497.
143. Schadwinkel, H., Selchow, O., Weisshart, K., Haarstrich, J. and Birkenbeil, J (2020). How to Get Best Images with Various Types of Immersion Media and Clearing Agents. Dostupné z <https://www.zeiss.com/microscopy/int/products/imaging-systems/light-sheet-microscope-for-lsfm-imaging-of-live-and-cleared-samples-lightsheet-7.html>
144. Shang, B., Liu, Y., Jiang, S., and Liu, Y. (2015). Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* 5.
145. Shchors, K., Shchors, E., Rostker, F., Lawlor, E.R., Brown-Swigart, L., and Evan, G.I. (2006). The Myc-dependent angiogenic switch in tumors is mediated by interleukin 1 $\beta$ . *Genes Dev.* 20, 2527–2538.
146. Siemann, D.W. (2011). The Unique Characteristics of Tumor Vasculature and Preclinical Evidence for its Selective Disruption by Tumor-Vascular Disrupting Agents. *Cancer Treat. Rev.* 37, 63–74.
147. Silvestri, L., Costantini, I., Sacconi, L., and Pavone, F.S. (2016). Clearing of fixed tissue: a review from a microscopist's perspective. *J Biomed Opt* 21, 081205.
148. Steele, K.E., Tan, T.H., Korn, R., Dacosta, K., Brown, C., Kuziora, M., Zimmermann, J., Laffin, B., Widmaier, M., Rognoni, L., *et al.* (2018). Measuring multiple parameters of CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes in human cancers by image analysis. *J. Immunother. Cancer* 6.
149. Stewart, J.C., Villasmil, M.L., and Frampton, M.W. (2007). Changes in fluorescence intensity of selected leukocyte surface markers following fixation. *Cytometry A* 71, 379–385.
150. Sunasee, R. and Narain, R. (2014). Covalent and Noncovalent Bioconjugation Strategies v Chemistry of Bioconjugates: Synthesis, Characterization nad Biomedical Applications. *Wiley* 1 – 75.

151. Susaki, E.A., Tainaka, K., Perrin, D., Kishino, F., Tawara, T., Watanabe, T.M., Yokoyama, C., Onoe, H., Eguchi, M., Yamaguchi, S., *et al.* (2014). Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. *Cell* 157, 726–739.
152. Susaki, E.A., Tainaka, K., Perrin, D., Yukinaga, H., Kuno, A., and Ueda, H.R. (2015). Advanced CUBIC protocols for whole-brain and whole-body clearing and imaging. *Nat. Protoc.* 10, 1709–1727.
153. Tainaka, K., Kubota, S.I., Suyama, T.Q., Susaki, E.A., Perrin, D., Ukai-Tadenuma, M., Ukai, H., and Ueda, H.R. (2014). Whole-body imaging with single-cell resolution by tissue decolorization. *Cell* 159, 911–924.
154. Tainaka, K., Murakami, T.C., Susaki, E.A., Shimizu, C., Saito, R., Takahashi, K., Hayashi-Takagi, A., Sekiya, H., Arima, Y., Nojima, S., *et al.* (2018). Chemical Landscape for Tissue Clearing Based on Hydrophilic Reagents. *Cell Rep.* 24, 2196–2210.
155. Tanaka, N., Kanatani, S., Tomer, R., Sahlgren, C., Kronqvist, P., Kaczynska, D., Louhivuori, L., Kis, L., Lindh, C., Mitura, P., *et al.* (2017). Whole-tissue biopsy phenotyping of three-dimensional tumours reveals patterns of cancer heterogeneity. *Nat. Biomed. Eng.* 1, 796–806.
156. Technical Tip: Greater Control and More Reaction Time with SDP Ester, 2007 [online]. [cit. 2020-07-08] Dostupné z: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/x30052.pdf>
157. Tissue Clearing Kit | binaree.com. HOME | binaree.com [online]. [cit. 2020-08-09] Dostupné z: <https://www.binaree.com/binaree-tissue-clearing-kit>
158. TMExplore™: HalioDx, 2020 [online]. [cit. 2020-04-30] Dostupné z: <https://www.haliidx.com/biopharma-services/tmexploretm/>
159. Tyson, A.L., Akhtar, A.M., and Andrae, L.C. (2019). Optimisation and validation of hydrogel-based brain tissue clearing shows uniform expansion across anatomical regions and spatial scales. *Sci. Rep.* 9.
160. Ueda, H.R., Ertürk, A., Chung, K., Gradinaru, V., Chédotal, A., Tomancak, P., and Keller, P.J. (2020). Tissue clearing and its applications in neuroscience. *Nat. Rev. Neurosci.* 21, 61–79.
161. Uhlén, P., and Tanaka, N. (2018). Improved Pathological Examination of Tumors with 3D Light-Sheet Microscopy. *Trends Cancer* 4, 337–341.
162. Van den Eynde, M., Mlecnik, B., Bindea, G., Fredriksen, T., Church, S.E., Lafontaine, L., Haicheur, N., Marliot, F., Angelova, M., Vasaturo, A., *et al.* (2018). The Link between the Multiverse of Immune Microenvironments in Metastases and the Survival of Colorectal Cancer Patients. *Cancer Cell* 34, 1012–1026.e3.
163. Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* 324, 1029–1033.

164. Walker, C., Mojares, E., and del Río Hernández, A. (2018). Role of Extracellular Matrix in Development and Cancer Progression. *Int. J. Mol. Sci.* 19.
165. Wang, M., Zhao, J., Zhang, L., Wei, F., Lian, Y., Wu, Y., Gong, Z., Zhang, S., Zhou, J., Cao, K., *et al.* (2017). Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *J. Cancer* 8, 761–773.
166. Wang, W., Kandimalla, R., Huang, H., Zhu, L., Li, Y., Gao, F., Goel, A., and Wang, X. (2019). Molecular subtyping of colorectal cancer: recent progress, new challenges and emerging opportunities. *Semin. Cancer Biol.* 55, 37–52.
167. Weigel, A., Schild, D., and Zeug, A. (2009). Resolution in the ApoTome and the confocal laser scanning microscope: comparison. *J. Biomed. Opt.* 14, 014022.
168. Xu, J., Ma, Y., Yu, T., and Zhu, D. (2019a). Quantitative assessment of optical clearing methods in various intact mouse organs. *J. Biophotonics* 12, e201800134.
169. Xu, Y., Li, P., Wang, M., Zhang, J., and Wang, W. (2019b). Imaging the brain in 3D using a combination of CUBIC and immunofluorescence staining. *Biomed. Opt. Express* 10, 2141–2149.
170. Yang, B., Treweek, J.B., Kulkarni, R.P., Deverman, B.E., Chen, C.-K., Lubeck, E., Shah, S., Cai, L., and Gradinaru, V. (2014). Single-Cell Phenotyping within Transparent Intact Tissue through Whole-Body Clearing. *Cell* 158, 945–958.
171. Yu, J.W., Bhattacharya, S., Yanamandra, N., Kilian, D., Shi, H., Yadavilli, S., Katlinskaya, Y., Kaczynski, H., Conner, M., Benson, W., *et al.* (2018). Tumor-immune profiling of murine syngeneic tumor models as a framework to guide mechanistic studies and predict therapy response in distinct tumor microenvironments. *PLoS ONE* 13.
172. Yuan, Y. (2016). Spatial Heterogeneity in the Tumor Microenvironment. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6.
173. Zhang, X., Nie, D., and Chakrabarty, S. (2010). Growth factors in tumor microenvironment. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 15, 151–165.